

Biochemische Untersuchungen zur
Melaninsynthese und Endocytoseaktivität
von Zellkulturen des
HARDING-PASSEY-Melanoms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Humanbiologie
(Dr.rer.physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

HENRIETTE B. LEISING geb. CONRADS

aus Aachen

Marburg 1976

Druck: Mauersberger, Marburg

Biochemische Untersuchungen zur
Melaninsynthese und Endocytoseaktivität
von Zellkulturen des
HARDING-PASSEY-Melanoms

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

HENRIETTE B. LEISING geb. CONRADS

aus Aachen

Marburg 1976

Druck: Mauersberger, Marburg



Vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als Dissertation angenommen am 23.3.76
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Human-
medizin

Dekan: Prof. Dr. med. Oepen

Referent: Prof. Dr. med. Schachtschabel

Correferent: Prof. Dr. med. Schmid

Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AS	Aminosäure
BME	Basal Medium Eagle
cAMP	Adenosin-3', 5'-Monophosphat, cyclisch
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cpm	Counts per Minute
d.b.-cAMP	N ⁶ , O ^{2'} Dibutyryl-Adenosin-3', 5'- Monophosphat, cyclisch
Dimethyl POPOP	1,4- bis -2- (4- Methyl-5-Phenyloxazolyl)- Benzol
DNP	2,4-Dinitrophenol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
E 400	Extinktion bei 400 nm
ES	Earle's Salz Lösung
HPM-67	Zellen aus dem HARDING-PASSEY-Melanom, im April 1967 isoliert
HPM-73	Zellen aus dem HARDING-PASSEY-Melanom, im Herbst 1973 isoliert
IE	Internationale Einheit
LDH	Laktat-Dehydrogenase
μ CI	Mikrocurie
μ g	Mikrogramm
MSH	Melanocyten-Stimulierendes-Hormon
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
PCA	Perchlorsäure
POD	Peroxidase
PPO	2,5 Diphenyloxazol
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
TCA	Trichloressigsäure
TDR	Thymidindesoxyribose
Th	Theophyllin

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung und Fragestellung</u>	1
2. <u>Material und Methoden</u>	8
2.1. Zellen	8
2.1.1. Zellzucht in vivo	9
2.1.2. Zellzucht in vitro	10
2.1.3. Chromosomenanalyse	16
2.1.4. Bestimmung der Vermehrungs- geschwindigkeit	17
2.2. Bestimmung einiger Parameter des Zellstoffwechsels	20
2.2.1. Glukose Bestimmung	20
2.2.2. Laktat-Bestimmung	21
2.2.3. Pyruvat Bestimmung	22
2.2.4. Aminosäureanalyse	22
2.3. Bestimmung der Melaninsynthese	23
2.3.1. Fluorometrische Tyrosinase- bestimmung	23
2.3.2. Tyrosinasebestimmung mit radio- aktivem Tyrosin	24
2.3.3. Photometrische Melanin Bestim- mung	26
2.4. Bestimmung des cAMP-Gehaltes	26
2.5. Einfluß verschiedener Agenzien auf HPM-Zellen	29
2.5.1. Sauerstoff	29
2.5.2. Stickstoff	29
2.5.3. DOPA	29
2.5.4. Kupferionen	30
2.5.5. DOPA und Kupferionen	30
2.5.6. Tyrosin	30
2.5.7. Theophyllin und dibutyryl-cAMP	31
2.5.8. Verschiedene Serumkonzentratio- nen	31
2.5.9. Cholera toxin und Gangliosid	31
2.5.10. MSH	32
2.5.11. Resochin	32

	Seite
2.6. Einfluß von Melanosomen, Melanin und Tyrosinase auf HPM Zellkulturen	33
2.6.1. In vivo Markierung und Isolierung von Melanosomen	33
2.6.2. Verteilung der Radioaktivität im Protein- und Melaninanteil der Melanosomen	34
2.6.3. Markierung isolierter Melanosomen in vitro und Bestimmung des Tyrosineinbaus	35
2.6.4. Elektronenmikroskopie der Melanosomenpräparation	36
2.6.5. Herstellung von radioaktivem Melanin	36
2.6.6. Inkubation von HPM Kulturen mit Melanosomen, Melanin und Tyrosinase	37
2.7. Bestimmung von DNS- und Proteinsynthese mit Hilfe radioaktiv markierter Vorstufen	38
2.7.1. Konzentrationen der radioaktiven Substanzen im Kulturmedium	38
2.7.2. Aufarbeitung der Kulturen	38
2.7.3. Bestimmung der eingebauten Radioaktivität	39
3. <u>Ergebnisse</u>	40
3.1. Chromosomenanalyse	40
3.2. Zellwachstum und Bestimmung einiger Zellkomponenten	41
3.2.1. Proteingehalt und Verdopplungszeit	41
3.2.2. RNS-, DNS- und Proteingehalt	42
3.2.3. Melaniningehalt	42
3.3. Zellstoffwechsel	43
3.3.1. Glukoseverbrauch und Laktatbildung	43
3.3.2. Pyruvatbildung	46
3.3.3. Verbrauch und Bildung von Aminosäuren	46

3.4.	Bestimmungen der Tyrosinase-aktivität	47
3.4.1.	Fluorometrische Tyrosinasebestimmung	47
3.4.2.	Tyrosinasebestimmung mit radioaktivem Tyrosin	53
3.5.	Versuche zur Stimulierung der Melaninsynthese in HPM-Kulturen	55
3.5.1.	Einfluß von Sauerstoff	55
3.5.2.	Inkubation unter anaeroben Bedingungen	57
3.5.3.	Tyrosin	57
3.5.4.	DOPA	57
3.5.5.	Kupfer	58
3.5.6.	Kupfer + DOPA	58
3.5.7.	Einfluß der Serumkonzentration im Nährmedium auf HPM Zellkulturen	58
3.5.8.	Einfluß von Theophyllin und Dibutyryl-cAMP	62
3.5.9.	Ganglioside und Choleratoxin	67
3.5.10.	MSH	68
3.5.11.	Resochin	69
3.6.	Einfluß von Melanosomen, Melanin und Tyrosinase auf HPM Zellkulturen	71
3.6.1.	Fraktionierung von HPM Gewebe: Isolierung von Melanosomen und Bestimmung der Tyrosinaseaktivität	71
3.6.2.	Untersuchung von in vivo mit ^{14}C -Tyrosin markierten Melanosomen	73
3.6.3.	Melanosomenmarkierung in vitro	74
3.6.4.	Herstellung von ^{14}C markiertem Melanin	
3.6.5.	Behandlung von Zellkulturen mit Melanosomen	75
3.6.6.	Einfluß von Dinitrophenol (DNP) und Actidion auf die zelluläre Melanosomenaufnahme und Melaninbildung	82
3.6.7.	Behandlung der Zellen mit radioaktiv markiertem Melanin	85
3.6.8.	Behandlung der Zellen mit "Überstand" (lösliche Tyrosinase + Melanosomen)	86

	Seite
4. <u>Diskussion</u>	88
5. <u>Zusammenfassung</u>	110
<u>Literaturverzeichnis</u>	115

1. Einleitung und Fragestellung

Die Melanomzelle - ihre Abstammung und Entwicklung, ihr meist sehr bösartiges Verhalten im Wirtsorganismus und ihre Fähigkeit zur Melaninsynthese - ist schon Gegenstand vieler Arbeiten gewesen. Seit langem wird versucht, diesen Tumor chirurgisch (CADY u. MITARB., 1975) und chemotherapeutisch (BURKE u. MILTON, 1971; COHEN u. GREENSPAN, 1972; MOON u. MITARB., 1975) und in neuerer Zeit auch immunologisch (CHEE u. BODURTHA, 1974; HELLSTRÖM u. HELLSTRÖM, 1973; MAVLIGIT, 1974; MORTON, 1972; SCHIEFERSTEIN, 1975; VAN WIJCK, 1975) anzugehen, aber abgesehen von wenigen Spontanheilungen (G. SCHIEFERSTEIN, 1975) konnte bisher noch von keinem überzeugenden Erfolg berichtet werden.

Melanome gehen aus den pigmentbildenden Zellen hervor (W. SANDRITTER, 1971). Im Falle des HARDING-PASSEY-Melanoms lassen sich in der Hauptsache 2 Zelltypen unterscheiden: neoplastische Melanozyten und Makrophagen. Den größten Anteil machen dabei die neoplastischen Zellen aus, in der Mehrzahl Melanoblasten und weniger Melanocyten (H.G. HARDING, R.D. PASSEY, 1930). Neben diesen prinzipiell zur Melaninsynthese befähigten Zellen kommen überall im Tumor, vor allem aber in der Umgebung von Nekroseherden (HARDING u. PASSEY, 1930; MISHIMA, 1967) melaninhaltige Makrophagen vor.

Die Melanocyten sind die pigmentbildenden Zellen. Sie sind meist von bipolarer oder polypolarer Gestalt mit langen dendritenartigen Fortsätzen. Sie unterscheiden sich von anderen Zellen durch das Vorhandensein von Melanosomen. Diese Melanosomen sind die Orte der Melaninsynthese. Sie kommen in verschiedenen Reifegraden vor (ISHIKAWA u. FITZPATRICK, 1966; SEIJI u. MITARB., 1963; STANKA, 1971), und bestehen aus einer

Proteinmatrix, an der - katalysiert durch das Enzym Tyrosinase, das an diese Matrix gebunden ist - Melanin abgelagert wird.

Über die intrazelluläre Bildung der Melanosomen besteht noch keine endgültige Klarheit. Heute herrscht jedoch die Meinung vor, daß zunächst Vorstufen der Tyrosinase an den Ribosomen im Bereich des Golgi Apparates gebildet oder über das endoplasmatische Retikulum dorthin transprotiert werden (SEIJI u. MITARB., 1963).

Es gibt gute Hinweise, daß die Membranstruktur der Melanosomen vom Golgi Apparat gebildet wird, und daß darin die Tyrosinasevorstufen eingelagert werden (DROCHMANS, 1966; SEIJI u. MITARB., 1963; WELLINGS u. SIEGEL, 1959).

In diesem Stadium spricht man von Praemelanosomen (melaninfreie Partikel). Wie die Aktivierung der Tyrosinase in den Prämelanosomen unter in situ Bedingungen erfolgt, ist weitgehend ungeklärt. Nach erfolgter Aktivierung wird das Melanin allmählich in den Melanosomen angehäuft, bis schließlich dichtgepackte Melaningranula entstehen. In ihnen ist keine Tyrosinaseaktivität mehr feststellbar, in einem Melanocyten lassen sich alle verschiedenen Stadien vom Prämelanosom bis zum Melaningranulum nachweisen.

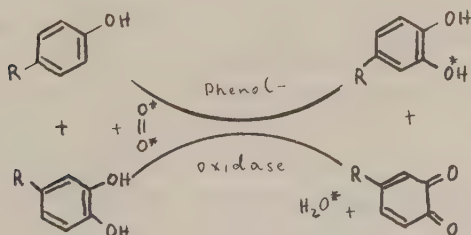
Im Falle der epidermalen, stark verzweigten Melanocyten ist bekannt, daß sie benachbarte Keratinocyten mit Melanin oder Melaningranula beimpfen können (DANNEEL, 1968; DROCHMANS, 1966; FITZPATRICK, 1965; HAMPERL, 1968). Dabei dringen die Ausläufer der Melanocyten mit ihren Enden in die Nicht-Melaninzellen ein und werden abgeschnürt. Nach einem "Auflösen" der Membran (dieser Ausläufer) werden die Melanosomen intrazellulär in den Keratinocyten freigesetzt. Der molekulare Mechanismus dieses Vorgangs ist unbekannt.

Ultrastrukturelle Untersuchungen haben gezeigt (HARDING u. PASSEY, 1930; HEMPEL, 1966; MISHIMA, 1967; VRBA, 1974), daß Melanin nicht nur in Melanocyten verschiedener Gewebe (Haut, Retina, Ciliarepithel u. a.) und in mit Melanin beimpften

Keratiocyten vorkommt, sondern auch in sogenannten Makro- bzw. Melanophagen - von Melanosomen. Ob dieses Melanin durch Exocytose aus Melanomelanocyten oder durch Phagocytose nekrotischer Melanocyten in die Melanophagen gelangt, ist nicht geklärt.

Die Biosynthese des Melanins wird von dem Enzym Tyrosinase katalysiert. Sie gehört zu den Oxydoreduktasen (E C 1.10.3.1. o-Diphenol:oxygen Oxydoreduktase) und katalysiert die direkte aerobe Oxydation von Monophenolen zu o-Diphenolen, zum Beispiel von Tyrosin zum Dopa (LANG, 1961). Inwieweit Tyrosinase in die weitere Oxydation bis zum Melanin eingreift, ist noch nicht endgültig geklärt.

Die Tyrosinase ist eine mischfunktionelle Oxydase (KARLSON, 1972), bei der das entstandene DOPA zugleich den Wasserstoffdonator darstellt (LERNER u. MITARB., 1949).

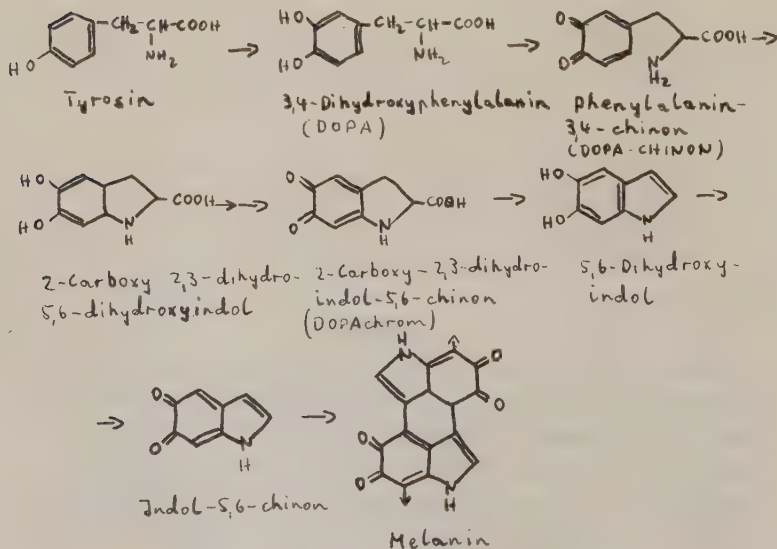


Das Enzym enthält etwa 4 Kupferatome. Der Oxydationsgrad des Kupfers in der Tyrosinase ist noch nicht genau bekannt. MAKINO u. MAC MURRAY, 1974 nehmen aufgrund ihrer Untersuchungen an, daß Kupfer hauptsächlich in der zweiwertigen Form vorliegt. Substanzen, von denen bekannt ist, daß sie mit

Kupfer Verbindungen eingehen - wie KCN, Diaethyl-
dithiocarbamat, Sulfid, CO, Cystin, Gluthathion
und BAL inhibieren das Enzym (JAMES, 1953).
Reagenzien, die mit SH-Gruppen reagieren, wie
Jodacetamid, p-Chloromercuribenzoat oder Cu^{2+} ,
inhibieren nicht.

Das Enzym ist in der Natur weit verbreitet
und kommt in unterschiedlichen Formen vor - sowohl
im pflanzlichen als auch im tierischen Organismus.
Im Säugetier-Melanom wurden 3 verschiedene, von-
einander trennbare Formen von aktiver Tyrosinase
gefunden: zwei lösliche und eine partikelgebundene
(BURNETT, 1971; SEIJI u. MITARB., 1963). Die par-
tikelgebundene Form kann zum Teil in eine der
löslichen überführt werden (BURNETT u. MITARB.,
1967; SEIJI, 1967; SEIJI u. YOSHIDA. 1968; SEIJI u.
MITARB. 1970; CHEN, 1974).

Die weiteren Schritte vom DOPA bis zum ent-
gültigen sehr komplex polymerisierten Melanin
laufen über Dopachinon und Dopachrom.



Bisher wurde schon von mehreren Arbeitskreisen versucht herauszufinden, welcher Kontrolle die Melaninsynthese in vivo unterliegt. Ein Schwerpunkt gegenwärtiger Forschung liegt in der Klärung der Rolle des cAMP bei der Ausprägung differenzierter Zellfunktionen (CHO-CHUNG, 1974; JOHNSON u. MITARB., 1971; VARGA u. MITARB., 1974; FURMANSKI u. MITARB., 1971; JOHNSON u. PASTAN, 1972, PRASAD, 1971).

So weiß man in Bezug auf melaninbildende Zellen, daß cAMP die Differenzierung von Melanoblasten zu Melanocyten beeinflusst (JOHNSON u. PASTAN, 1972). Ferner kommt es unter cAMP-Behandlung bei in vitro kultivierten Melanomzellen zu einer verlangsamten Verdopplungszeit, zu einer Erhöhung der Tyrosinaseaktivität, zu einer Akkumulation von Melanin in den einzelnen Zellen und zur verstärkten Ausbildung von Dendriten (KREIDLER u. MITARB., 1973; VARGA u. MITARB., 1974; JOHNSON u. PASTAN, 1972).

Eine intrazelluläre Erhöhung des cAMP-Gehaltes kann durch verschiedene Behandlungen erreicht werden, wie z.B. durch exogene Zugabe von cAMP oder durch Hemmung der das cAMP abbauenden Phosphodiesterase. Ferner wurde eine Beeinflussung des zellulären cAMP Gehaltes durch den Serumgehalt des Nährmechanismus nachgewiesen (OEY u. MITARB., 1974; GRIMM u. FRANK, 1972; SHEPPARD, 1972).

SUTHERLAND u. MITARB. beschrieben 1962 zum ersten Mal die "second messenger" Funktion für cAMP, wobei cAMP der intrazelluläre Vermittler für die Wirkung vieler Hormone ist. Diese Funktion konnte bei Catecholaminen, Glucagon, Insulin, ACTH, TSH, Vasopressin, Oxytocin, Parathormon, Angiotensin, Prostaglandin, Histamin und MSH nachgewiesen werden (MOLL, 1973; BITENSKY u. BURSTEIN, 1965). Dabei hat das Hormon die Funktion des "ersten Boten". Wenige Moleküle des Hormons erreichen die Zelle des Erfolgsorgans und aktivieren dort wahrscheinlich nach

Bindung an spezifische Rezeptoren die Adenylatzyklase in der Zellwand, die die Bildung von cAMP aus ATP katalysiert. (BITENSKY u. BURSTEIN, 1965; VARGA u. MITARB., 1974).

An Zellkulturen des Cloudman Melanoms konnte gezeigt werden, daß der cAMP Spiegel 10 Minuten nach der Einwirkung von MSH ansteigt. Nach einer Latenzzeit von 8-10 h ist eine erhöhte Tyrosinaseaktivität und später (nach etwa 2 Tagen) ein erhöhter Melanin-gehalt feststellbar (VARGA u. MITARB., 1974).

Auch vom Choleratoxin weiß man, daß es die Adenylatzyklase stimulieren (KEEFE u. CUATRECASAS, 1974; VANN BENNETT u. MITARB., 1975) und damit eine Erhöhung des cAMP Gehaltes verursachen kann. Dabei kommt es zu einer spezifischen Interaktion des Toxins mit zwei Membranglykolipiden, die in der Hauptsache mit dem sogenannten Gangliosid G₁ (=Gal B 1 → 3 Gal N Ac B 1 → 4 [Neu N Ac α 2] → 3 Gal B 1 → 4 Gluc. ceramid) (WIEGANDT u. MITARB., 1974; VAN HEYNINGEN, 1974) und weniger stark mit dem Gangliosid G₃.

Diese an der Zellwand vorhandenen Ganglioside binden das Choleratoxin, daß dann seine Wirkung auf die Adenylatzyklase in der Zellwand ausüben kann. So führte die Einwirkung von Choleratoxin auf S91 Cloudman Melanomzellen zu ähnlichen Effekten, wie sie auch bei Anwendung von cAMP beschrieben werden (KEEFE u. CUATRECASAS, 1974).

In den letzten Jahren ist es gelungen, melaninbildende Zellen auch in Langzeitkultur zu züchten (SCHACHTSCHABEL, 1969; SCHACHTSCHABEL, 1972). Solche Kulturen eignen sich für Untersuchungen zum Studium der Melanogenese und des Wachstumsverhaltens von Melanomzellen. In unserem Arbeitskreis werden 2 Zelllinien des HARDING-PASSEY Melanoms mit unterschiedlicher Poliferationsrate in Monolayer Kultur gezüchtet.

In der vorliegenden Arbeit sollen zunächst

- A. einige cytologische und biochemische Parameter zur Charakterisierung der verwendeten Zelllinien (Wachstumsgeschwindigkeit, Cancerogenität, Aspekte der Glykolyse und des Aminosäurestoffwechsels, Tyrosinaseaktivität und Melaningehalt) analysiert werden. Dann soll
- B. der Einfluß der folgenden Faktoren auf Wachstum und Melanogenese dieser Kulturen untersucht werden.
 1. Veränderung der Konzentrationen von Sauerstoff, Kupferionen, DOPA und Tyrosin im Nährmedium.
 2. Veränderung des extra- und möglicherweise intrazellulären cAMP-Gehaltes durch Zugabe von dibutyryl cAMP und des Phosphodiesterasehemmers Theophyllin.
 3. Veränderung der Serumkonzentrationen mit ihrer Auswirkung auf den cAMP Gehalt.
 4. Einwirkung von MSH und Choleratoxin.
 5. Einwirkung von Resochin (7-Chlor-4- (4'Di-
æthylamino-1'methylbutylamino)chinolin), von dem bekannt ist, daß es die Melanogenese von Organismen beeinflussen kann.
- C. Ferner soll versucht werden, die Fähigkeit dieser Zellen zur Phagozytose und Pinozytose (Endocytoseaktivität) zu bestimmen, insbesondere im Hinblick auf eine Endocytose von Melanosomen, Melaninpartikeln und Tyrosinase.

Diese Arbeit soll ein Beitrag sein zur Klärung von Bedingungen, die die Melanogenese und die Endocytose dieser Melanomzellen in Kultur beeinflussen oder regulieren.

2. Material und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Reagenzien als pA Substanzen von der Fa. E. Merck, Darmstadt, bezogen. Biochemikalien stammen von Fa. Boehringer, Mannheim und Radiochemikalien von Amersham -Buchler, Braunschweig. Entionisiertes und doppelt destilliertes Wasser wurde zum Ansetzen von Lösungen oder zur Herstellung von Kulturmedien verwendet.

2.1. Zellen

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden an in vivo oder in vitro gezüchteten Zellen des HARDING-PASSEY-Melanoms durchgeführt.

Das HARDING-PASSEY-Melanom, ein am Ohr einer Maus spontan entstandener melaninbildender Tumor, wurde im Herbst 1925 von dem Pathologen R.D. PASSEY an der Leeds University Medical School in Leeds, England (HARDING u. PASSEY, 1930) isoliert. Der Tumor war etwa gerstenkorngroß, in seiner Form gelappt und dunkel pigmentiert. Die histologische Untersuchung zeigte keine Infiltration in den Ohrknorpel und die Epidermis.

H.E. HARDING und R.D. PASSEY benutzten diesen Tumor zur Transplantation auf braune Mäuse, die aus verschiedenen Stämmen gekreuzt wurden. Später gelang es, diese Tumoren auch auf weißen C 57 - BL -, DBA-, C3H- und Agouti Mäusen weiterzuzüchten (SUGIURA, 1948).

Die Angehrate bei subsutaner Implantation betrug ca. 95% (SUGIURA, 1948), wobei nach etwa 16 Wochen sich ein Tumor mit einem mittleren Durchmesser von 5 cm ausgebildet hatte. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tumoren meist ulzeriert. Wenige Wochen später

starben die Mäuse im allgemeinen an Sepsis oder Ernährungsstörungen.

2.1.1. Zellzucht in vivo

Für die in vivo Züchtung der HPM Zellen wurden weiße, ca. 30 g schwere NMRI Mäuse (Zucht des Physiolog.Chem.Inst.II, Universität Marburg) verwendet. Pro Tier wurden 0,2 ml Melanomgewebesuspension¹⁾ (1 Teil Gewebe + 1 Teil serumfreies Kulturmedium im Mörtel zerrieben) unter Verwendung einer Kanüle (Rekord, 1,5 mm Ø, Fa. Braun, Melsungen) subcutan in die hintere rechte Rückenhälfte injiziert. Nach 4 ± 1 Wochen waren an der Implantationsstelle stecknadelkopfgroße Knötchen tastbar, die dann in den folgenden Monaten bis zu einem Tumorgewicht von 25-30 g weiterwuchsen. Nach 10 ± 3 Wochen (n= 69) starben die Mäuse. Die Obduktion ergab, daß es sich um solide, von einer Bindegewebskapsel umgebene Tumoren handelte, die auf der Schnittfläche gleichmäßig schwarz pigmentiert waren.

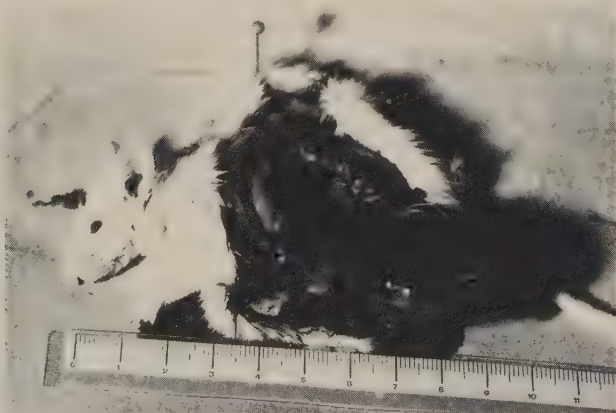


Abb. 1: Melanom: 8 Wochen nach subcutaner Injektion von 1×10^6 Kulturzellen des HARDING-PASSEY-Melanoms

1) Wir danken der Fa. Hoechst für die freundliche Überlassung von 3 HARDING-PASSEY-Melanom tragenden Mäusen.

2.1.2. Zellzucht in vitro

a. Kulturmedien

Als Kulturmedium, in dem diese Zellen permanent in vitro gezüchtet wurden, diente Basal Medium Eagle's (BME) (EAGLE, 1955), dem Antibiotika und, wenn nicht anders angegeben, 10% foetales Kalbsserum zugesetzt wurden. Eagler Basal Medium mit Earles Salzen (EARLE, 1943) und Glutamin, ohne NaHCO_3 und Serum wurden von der Fa. Grand Island, Biological Company, New York, bezogen.

Basal Medium Eagle ist folgendermaßen zusammengesetzt:

BASAL MEDIUM (EAGLE) mit "Earle's Salzen"

Bestandteil	mg/L	Bestandteil	mg/L
NaCl	6800,0	L-Methionin	7,50
KCl	400,0	L-Phenylalanin	16,50
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	140,0	L-Threonin	24,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200,0	L-Tryptophan	4,0
CaCl_2 (anhyd.)	200,0	L-Valin	23,50
NaHCO_3	2200,0	Biotin	1,0
Glukose	1000,0	Folsäure	1,0
L-Glutamin	292,0	Cholin	1,0
L-Arginin HCl	21,0	Nicotinsäureamid	1,0
L-Cystin	12,0	D-Ca-Pantothersäure	1,0
L-Tyrosin	18,0	Pyridoxal HCl	1,0
L-Histidin	8,0	Thiamin HCl	1,0
L-Isoleucin	26,0	Riboflavin	0,10
L-Leucin	26,0	meso-Inosit	1,80
L-Lysin	26,0	Phenolrot	10,0

Ref.: Earle, W.R., J. Natl. Cancer Inst. 4, 167
(1943) Eagle, H., Science 122, 501 (1955)

Modifiziert: $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ anstelle von $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Das Trockenpulver wurde unter sterilen Bedingungen mit einem Magnetrührer in frischem Aquabidest. gelöst.

Pro Liter Nährmedium wurden zugesetzt:

2,2 g NaHCO_3

5 ml 1N HCl

100 000 IE Penicillin-G-Natrium (Fa. Grünenthal,
Stolberg)

135 mg Streptomycin-Sulfat (Fa. Bayer, Leverkusen)

100 ml Serum

Anschließend wurde das Medium mit einem Druckfiltrationsgerät SM 162 28 (Fa. Sartorius, Göttingen) (Porengröße der Membranfilter $0,22 \mu\text{m}$) steril filtriert.

Teilweise wurde der Tyrosingehalt des Mediums von $18 \mu\text{g/ml}$ auf $72 \mu\text{g/ml}$ erhöht (= 4x Tyrosin Medium). Bei verschiedenen Experimenten wurde der Gehalt an foetalem Kalbsserum von 0-30% variiert.

b. Kulturzellen

Es wurden 2 Zelllinien verwendet:

1. die sogenannte HPM-67 Linie (SCHACHTSCHABEL, 1971)
2. die sogenannte HPM-73 Linie, im November 1973 aus einem Mausmelanom von SCHACHTSCHABEL isoliert und in vitro weitergezüchtet.

HPM 73

Für die in vitro Züchtung wurden nach aseptischer Freilegung des Tumors einzelne Gewebestückchen ohne anhängendes Bindegewebe entnommen. Nach dreimaligem Waschen mit Nährmedium wurde das Gewebe, sofern es nicht "spontan" in Bröckchen desintegrierte, mittels einer Schere in kleine Stückchen (ϕ 1 mm) zerschnitten.

Von der Gewebesuspension wurden je 5 ml auf steri-

lisierte 2 ounce Kulturflaschen (Fa. Brockway-Glass Comp., New York) überführt. Von da an wurden die Kulturen im Brutschrank bei 37° inkubiert.

Bei der Inkubation liegen die Flaschen waagerecht. Die Zellen, die bei der Einsaat noch in Suspension vorliegen, sinken im Medium ab und haften nach etwa einer Stunde an der Glaswand der Kulturflaschen. Der Zellrasen ist im allgemeinen nicht einschichtig ("monolayer"), sondern zeigt an vielen Stellen "Zellaggregate" oder mehrschichtiges Wachstum.

Das Nährmedium der HPM 73 Kulturen wird alle 24 oder 48 h gewechselt. Dazu wird unter sterilen Bedingungen das verbrauchte Medium dekantiert und je nach Zellmenge 5 - 15 ml frisches, auf 37° angewärmtes Kulturmedium mit einer Pipette zugegeben.

Bei niedriger Zelleinsaat $1-4 \times 10^4/\text{cm}^2$ Glas-haftfläche) werden die Kulturen mit einem Gemisch von 7% CO₂, 20% O₂ und 73% N₂ (Fa. Messer-Griesheim, Dillenburg) begast, um ein Alkalisieren (pH 7,6 - 7,8) zu verhindern. Die optimalen Wachstumsbedingungen liegen etwa bei einem pH Wert von 7,2. Bei hoher Zelleinsaat ($1-2 \times 10^5/\text{cm}^2$) bedürfen die Kulturen wegen genügender "Säuerung" (hauptsächlich aufgrund von Laktatbildung) keiner Begasung.

Die Subkultivierung geschieht etwa alle 4 Wochen durch Abschaben des Zellrasens im Nähremedium mit einem Gummiwischer. Die so erhaltene Zellsuspension wird je nach Menge auf 3-5 neue Flaschen übertragen.

Bedingt durch die starke Verästelung werden ca. 50% der HPM Zellen bei der Subkultivierung rupturiert.

Durch Reinokulation der Kulturzellen auf NMRI Mäuse wurden ihre cancerogenen Eigenschaften nach in vitro Kultivierung überprüft. Dazu wurden sie in frischem

Medium abgelöst, abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und jeweils 0,2 ml subcutan den Mäusen in die hintere rechte Rückenhälfte injiziert. Pro Maus wurden dabei $1,3 \times 10^6$ Zellen injiziert, von denen aber nur etwa 50% "vital" (mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau nicht anfärbbar) waren.

Die Tumoren gingen bei 70% der geimpften Mäuse an, waren nach 7 ± 4 Wochen zuerst tastbar und führten nach 13 ± 7 Wochen zum Tod ($n=10$). In einem Fall wurden mehrere kleine Metastasen in der Leber gefunden.

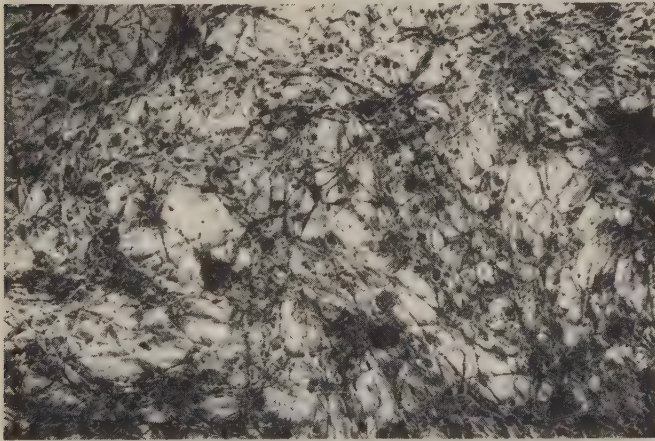


Abb. 2: Pigmenthaltige HARDING-PASSEY-Melanomzellen in Monolayer-Kultur. (HPM - 73 Zellen)

c. HPM 67 Zellen

Als weitere Zelllinie des HARDING-PASSEY-Melanoms wurden die HPM 67 Zellen verwendet. Diese Zellen wurden im April 67 von SCHACHTSCHABEL aus dem HARDING-PASSEY-Melanom isoliert (SCHACHTSCHABEL 1971) und seitdem in Kultur gehalten. Diese Zellen sind

nur noch im geringen Maße zur Melaninsynthese in Kultur befähigt, wachsen bedeutend schneller in vitro und sind sehr viel weniger stark verästelt als die HPM 73 Zellen.

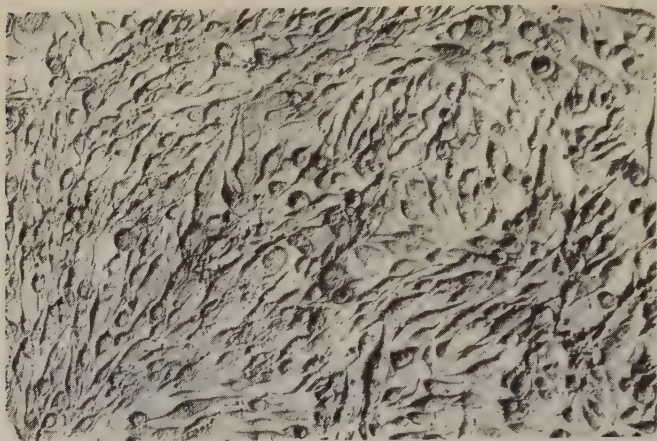


Abb. 3: Pigmentärmere HARDING-PASSEY-Melanomzellen in Monolayer-Kultur (HPM - 67 Zellen)

Auch hier wurden die cancerogenen Eigenschaften geprüft durch Verimpfen der in vitro gezüchteten Zellen auf NMRI Mäuse. Dazu wurden pro Maus 1-12 Millionen Zellen in BME Medium injiziert, von denen, gemessen an der Trypanblaufärbung, nur etwa 50% vital waren. Nach Injektion von 1×10^6 Zellen / Maus traten bei 45% der Mäuse ($n=15$) nach 14 ± 1 Wochen Tumoren auf. Die Tiere starben nach 32 ± 5 Wochen. Bei $5-12 \times 10^6$ Zellen / Maus gingen die Tumoren nach $2,5 \pm 2$ Wochen an und führten nach 11 ± 1 Wochen zum Tod. 50% der Tiere wurden befallen ($n=4$). Die Obduktion der nach Injektion von HPM Kulturzellen entstandenen Melanome ergab bei 3 von 9 Mäusen das Bild eines schwarz pigmentierten Tumors mit grauen bis weißlichen Bezirken, die etwa ein

Viertel bis zur Hälfte der gesamten Tumormasse ausmachten. Die histologische Untersuchung zeigte , daß es sich in den helleren Gebieten um Gewebe mit wesentlich weniger Melaningehalt handelt, das bei noch längerem Wachstum zum amelanotischen Melanom führen kann.

Diese weniger melanotischen Tumoren zeigten ein wesentlich schnelleres Wachstum als die melanotischen.

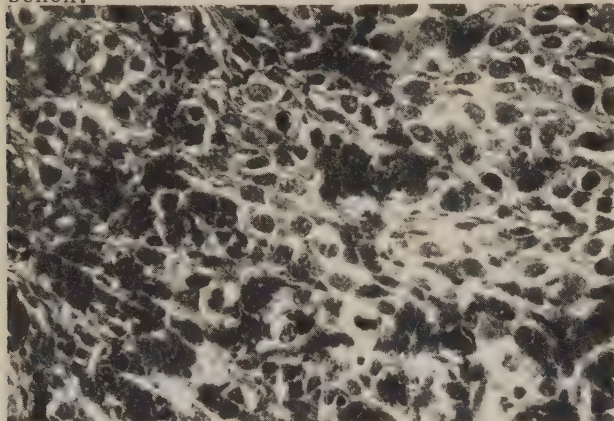


Abb. 4: Histologischer Schnitt eines stark pigmentierten H.P.-Melanoms. Färbung Hämatoxylin
Vergrößerung 550 fach

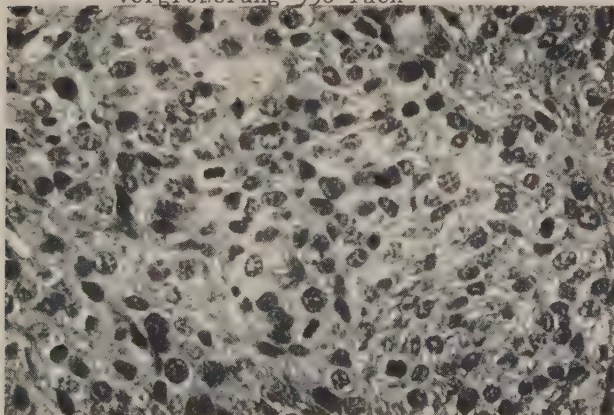


Abb. 5: Histologischer Schnitt eines pigmentarmen H.P.-Melanoms. Färbung Hämatoxylin
Vergrößerung 550 fach

Die von uns in vitro gezüchteten Zellen waren bei der Überprüfung frei von Mycoplasmen.²⁾

d. Experimente mit in vitro gezüchteten Zellen

Zu jedem Experiment wurden 25-45 Kulturen gleichzeitig mit gleicher Zellzahl und unter gleichen Bedingungen angesetzt, die durch Subkultivierung aus 3-5 Stammkulturen gewonnen wurden. Die Zellen erhielten am Tag nach dem Transferieren und von dann an jeden zweiten Tag frisches Medium. Nach 3 oder 5 Tagen wurden die Substanzen zugesetzt, die auf ihre Wirkung untersucht werden sollten.

2.1.3. Chromosemenanalyse

Zur Bestimmung der Chromosomenzahl der HPM-Zellen wurden $1-2 \times 10^6$ exponentiell wachsende Zellen 16 bis 20h mit Velban (Fa. Gibco, New York) (0,05 mg/ml) behandelt. Velban ist ein Mitosehemmer und wirkt ähnlich wie Colchizin. Es erhöht die Zahl der in der Metaphase befindlichen Zellen, da es die Ausbildung der Spindeln verhindert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit einem Gummiwischer von der Glaswand abgelöst. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 2000 g (MSE Super Minor Zentrifuge) zentrifugiert. Es folgte eine 15 minütige hypotone Behandlung mit 0,5 ml 0,7% Natriumcitratlösung bei 37°.

Nach Zugabe von 6 Tropfen Carnoys Fixativ (3 Teile Methanol, 1 Teil Eisessig) wurden die Zellen abzentrifugiert, in wenig frischem Fixativ aufgenommen und 20 Minuten im Kühlschrank belassen.

2) Frau Dr. PUPPEL, Universität Marburg, Hygiene Institut danke ich für die Untersuchung auf Mycoplasmen

Es wurde erneut zentrifugiert und das Sediment mehrmals mit je 0,5 ml Fixativ überschichtet bis der Überstand klar blieb. Zum Schluß wurde dem Sediment so viel Fixativ zugegeben, bis eine opaleszente Suspension entstand.

Diese Präparate wurden gefärbt, entwässert und eingebettet nach der Methode von HIRSCHHORN (HIRSCHHORN 1967). Zur Auswertung verwendet wurde jede vollständige einwandfrei zählbare Metaphase.

2.1.4. Bestimmung der Vermehrungsgeschwindigkeit

Bei einer asynchron wachsenden Zellpopulation kann die Vermehrungsgeschwindigkeit auf verschiedene Weisen erfaßt werden. Das Wachstum kann anhand der Vermehrung der Zellzahl oder eines anderen Zellparameters, wie DNS-, RNS- oder Proteingehalt, gemessen werden, da bei einer asynchron wachsenden Kultur der durchschnittliche zelluläre Gehalt dieser Parameter konstant bleibt.

a. Zellzählung und Trypanblaufärbung

Die Zellzählung wird unter dem Mikroskop durchgeführt. Um genaue reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen, muß von einer Zellsuspension eine große Anzahl von Zellen (etwa 1 000) ausgezählt werden. Die Methode ist sehr zeitraubend, hat aber den Vorteil, daß man bei vorherigem Anfärben mit Trypanblau den Anteil an geschädigten Zellen mitbestimmen kann. Die Zellen wurden im Nährmedium von der Glaswand abgelöst, zentrifugiert und in einer kleinen Menge Medium ($3-5 \times 10^6$ Zellen/ml) suspendiert. 1 Teil Zellsuspension wurde mit 1 Teil Trypanblaulösung (0,4% in ES) versetzt und in die Zählkammer eingefüllt (Neubauer Zählkammer, Firma American Optical Company, Instrument Division, Buffalo, New York, USA).

Trypanblau ist ein Farbstoff, der zur Unterscheidung von "lebenden" und "toten" Zellen verwendet wird. Lebende Zellen haben die Fähigkeit, in einer Trypanblaulösung den Farbstoff nicht in die Zelle eindringen zu lassen, während "tote" oder membran-geschädigte Zellen angefärbt werden.

b. Bestimmung des Proteingehaltes

Aus einem Kollektiv von gleichzeitig, mit gleicher Zellzahl und unter gleichen Bedingungen angesetzten Kulturen wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten je 2 Kulturen zur Gesamtproteinbestimmung entnommen.

Dazu wurde das Medium dekantiert, die noch am Glas haftenden Zellen 4 mal mit eiskalter Earle's Salzlösung (EARLE, 1943), 2 mal je 5 Minuten mit 5%iger Trichloressigsäure in der Kälte (0°) und zum Schluß viermal mit 96%igem Aethanol gewaschen. Zum Lösen des extrahierten und getrockneten Zellrasens wurde mit 1 N NaOH 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Von dieser Lösung wurden 0,2 ml zur Proteinbestimmung nach LOWRY u. MITARB. (1951), in der Modifikation nach OYAMA und EAGLE (1956), eingesetzt. Bei jeder Bestimmung wurden als Referenz mehrere Albuminkonzentrationen (25, 50, 75, 100, 150, 200 μ g/Ansatz) mitgemessen (Rinderalbumin: Fa. Sigma, St. Louis, MO, USA).

Die Extinktionsmessung erfolgte 10 - 30 Minuten nach Vermischen des Bestimmungsansatzes. Bei Einhaltung dieser Bedingung ist eine lineare Beziehung zwischen Farbbildung und Proteinkonzentration (im Bereich zwischen 5 und 200 μ g) zu erzielen.

Reagenzien: Lowry A: 20,0 g Na_2CO_3
0,268 g K Na Tartrat x 4 H_2O
100 ml 1N NaOH
ad 1000 ml Aqua bidest.

Lowry B: 0,5 g CuSO_4 x 5 H_2O / 100 ml
 H_2O

Phenol Reagenz (Folin):

5 ml Folin Ciocalteau Phenol
Reagenz

6 ml Aqua bidest.

Photometer: Zeiss Spektralphotometer PM4

c. Bestimmung des RNS Gehaltes (CERIOTTI, 1955)

Ein Aliquot einer Zellsuspension in ES (ca. 2×10^6
Zellen) wurde abzentrifugiert, gewaschen mit

1 mal 0,25 M HClO_4 (0°C)

2 x Aethanol 96%

2 x Aethanol: Aether (1:1)

1 x Aether

und mit 1 ml 0,5 N HClO_4 20 Minuten bei 70° hydro-
lysiert. Zur vollständigen Extraktion von RNS und
DNS wurde eine 2. Hydrolyse mit 1 ml 0,5 N HClO_4
angeschlossen.

Nach Vereinigen der Hydrolysate wurden

0,5 ml Hydrolysat

0,5 ml 0,5 N HClO_4

1 ml Orcinol Reagenz

40 Minuten bei 100° gehalten. Nach dem Abkühlen
wurde die Extinktion bei 675 nm gemessen.

Bei jeder Bestimmung wurde ein Adenosin Stan-
dard mitgemessen. (0,5 ml einer 5×10^5 M Lösung,
0,5 ml HClO_4 1 ml Orcinol Reagenz)

Reagenzien: 1) 68,2 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ / 100 ml
konz HCl ($d=1,19$)

2) 200 mg Orcinol in 90ml 12 N HCl

10 ml Reagenz 1 + 90 ml Reagenz 2 = Orcinol Reagenz

Zur Umrechnung von Adenosin - auf RNS-Gehalt
wurde der Faktor 2,4 verwendet.

d. Bestimmung des DNS Gehaltes (BURTON, 1955)

0,5 ml von dem für die RNS Bestimmung erhaltenen
Hydrolysat wurden mit 1 ml Diphenyl-Reagenz ver-
setzt. Nach 16 - 25 stündigem Stehen bei 25 - 30°
wurde die Extinktion bei 600 nm gemessen.

Reagenzien: 1) 7,5 g wasserdampfdestilliertes Dipheny-
lamin / 500 ml Eisessig
+ 7,5 ml konz. H_2SO_4

2) 2 ml Acetalsehyd (spez. Gew. 0,78) /
100 ml H_2O

Unmittelbar vor Gebrauch mischen: 20 ml Reagenz 1 +
0,5 ml Reagenz 2 = Diphenylreagenz.

Als Standard diente Desoxyadenosin (10^{-4} M), der
Umrechnungsfaktor betrug 2,46.

2.2. Bestimmung einiger Parameter des Zellstoff- wechsels

2.2.1. Glukose Bestimmung

Die Bestimmung von D-Glukose im Nährmedium erfolgte
mit der Biochemica Testkombination "Blutzucker -
GOD - Farbttest" der Fa. Boehringer, Mannheim.

Prinzip: $\beta\text{-D-Glukose} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{GOD}}$

Gluconsäure + H_2O_2

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{o} - \text{Dianisidin} \xrightarrow{\text{POD}}$

$2\text{H}_2\text{O} + \text{oxidiertes Anisidin}$

Um die Empfindlichkeit der Bestimmung zu erhöhen, wurde für die Enteiweißung die Boehringer Vorschrift wie folgt modifiziert:
0,3 ml Medium wurden mit 0,6 ml 0,45 N Perchlorsäure enteiweißt. Dadurch konnte die Glukosekonzentration um dreifache erhöht werden im Vergleich zum Normalansatz.

Reagenzien: 0,45 N HClO_4
0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 ; 40 μg
POD/ml, 250 μg GOD/ml
6,6 mg O-Dianisidin HCl /ml

Testansatz: 0,2 ml enteiweißte Probe
5 ml enzymhaltiger Puffer + Dianisidin

Nach 35 - 60 minütigem Stehen bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 436 nm der Probe gegen den Leerwert gemessen.

2.2.2. Laktatbestimmung

Die Laktatbestimmung wurde entsprechend den Angaben der Boehringer Testkombination "Laktat" gemacht.

Prinzip: L-Laktat + NAD^+ + Hydrazin $\xrightarrow{\text{LDH}}$
Pyruvat - Hydrazon + $\text{NADH} + \text{H}^+$

Enteiweißung: 0,25 ml Medium + 0,5 ml 0,6 N HClO_4
Zentrifugation nach 10minütigem Stehen bei 10000 g.

Reagenzien: 0,6 N PCA
Glycin/Hydrazin Puffer 0,5M/0,4M pH 9,0
0,027 M NAD Lösung
Laktat Dehydrogenase 5 mg / ml

Testansatz: 2,0 ml Puffer
0,2 ml Überstand nach Enteiweißung
0,2 ml NAD Lösung
0,02 ml LDH

2.2.3. Pyruvat Bestimmung

Zur Pyruvat Bestimmung diente die Boehringer Testkombination "Pyruvat"

Prinzip: $\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{Laktat} + \text{NAD}^+$

Enteweißung: 1 ml Medium + 1 ml 1N Perchlorsäure

Reagenzien: 0,7 M Trikaliumphosphat

2,5 M NADH

2 mg LDH / ml

Nach der Enteweißung wurde die überschüssige PCA mit K_3PO_4 gefällt und nach 15 Minuten in der Kälte zentrifugiert.

Testansatz: 1,5 ml zentrifugierter Überstand

0,15 ml NADH Lösung

mischen, 1. Extinktion bei 366 nm messen

0,015 ml LDH Suspension

mischen, nach 6 Minuten 2. Extinktion bei 366 nm messen.

2.2.4. Aminosäureanalyse

Zur Aminosäureanalyse wurden 5 ml Kulturmedium mit 0,2 ml 70%iger PCA zur Enteweißung versetzt. Nach 10 minütigem Stehen wurde bei 10 000 g zentrifugiert und das Perchlorat mit 0,4 ml 5 M KOH ausgefällt. Der Überstand wurde über Nacht lyophilisiert, der Rückstand in 3 ml Probenaufnahmepuffer aufgenommen und die nicht gelösten Anteile abfiltriert. Die Trennung und quantitative Bestimmung³⁾ der Aminosäuren erfolgte mit Hilfe des Aminosäureanalysators Biocal LKB. Dazu wurde 1 ml der Probenlösung auf die Harzsäule aufgetragen. Die einzelnen Aminosäuren wurden automatisch mit verschiedenen Puffern eluiert, mit Ninhydrin angefärbt und aus dem Vergleich der Extinktionen der Probenlösung und eines Testgemisches

3) Frau Dr. D. Ebert, Universität Marburg, Biopolymeren Chemie, danke ich für die gewissenhafte Ausführung der Aminosäureanalysen.

mit genau definiertem AS Gehalt die Konzentration der einzelnen Aminosäuren berechnet.

Probenaufnahmepuffer: 0,2 M Na-Citrat Puffer pH 2,2

2.3. Bestimmung der Melaninsynthese

2.3.1. Fluorometrische Tyrosinasebestimmung

Bei der Hydroxylierung von Tyrosin unter der katalytischen Wirkung von Tyrosinase ist DOPA das erste Oxydationsprodukt. Dieses gebildete DOPA wurde mit der fluorometrischen Testmethode nach ADACHI und HALPRIN (ADACHI u. HALPRIN, 1967; BERTLER u. MITARB., 1958) bestimmt. Nach diesen Autoren ist das Ausmaß der DOPA-Bildung, sofern eine Weiteroxydation des DOPA verhindert wird, proportional zur Tyrosinaseaktivität.

Die Bestimmung beruht auf der Oxydation des DOPAs durch $K_3[Fe(CN_6)]$ zu 5,6-Dihydroxyindol und 5,6 - Dihydroxyindol - 2 -carbonsäure (CARLSSON u. WALDECK, 1958).

Nach genau zweiminütiger Oxydation wird die Reaktion durch Zugabe von Ascorbinsäure gestoppt, wobei alles noch vorhandene $K_3[Fe(CN_6)]$ reduziert wird, so daß eine Weiteroxydation nicht mehr erfolgen kann.

Im alkalischen Milieu ergeben das entstandene Dihydroxyindol und die Dihydroxyindolcarbonsäure eine starke Fluoreszenz.

Mit einem DOPA-Standard (5 μ g/Probe) wurden die günstigsten Wellenlängen für die Excitation und die Emission am Perking-Elmer-Hitachi Spektralfluorometer Modell MPF - 2A ermittelt.

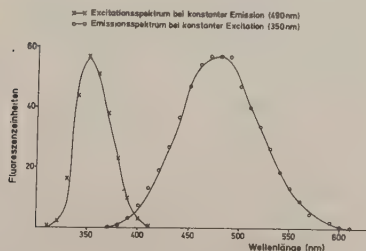


Abb. 7:
Excitations- und Emissionsspektrum von DOPA

In geringer Abweichung zu ADACHI u. HALPRIN (1967) wurden für weitere Messungen der Excitation eine Wellenlänge von 350 nm und für die Emission eine von 490 nm gewählt. Unter diesen Bedingungen ergab sich eine Proportionalität zwischen DOPAgehalt und Fluoreszenz.

Enzymlösung: 1 T Melanomgewebe + 19 T BME oder ES
20 x "gepottert" bei 0°
10 min bei 1900 g zentrifugiert
Überstand = Enzymlösung
oder

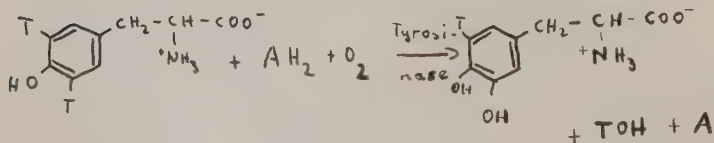
Pilztyrosinase (Fa. Serva, Heidelberg)
525 E / mg
0,5; 1,0; 2,5; 10,0 E / Inkubationsansatz

Blank: 5 Minuten bei 100° gehaltene Enzym-
lösung

Inkubations- 40 μ l Phosphatpuffer 40 mM pH 6,9
ansatz: 20 μ l Ascorbinsäure (13,2 mg/10 ml)
20 μ l L-DOPA (1,972 mg/10 ml)
100 μ l Enzymlösung
20 μ l L-Tyrosin (13,6 mg/10 ml 0,02 N
NaOH)

2.3.2. Tyrosinasebestimmung mit radioaktivem Tyrosin

Nach POMERANTZ (1964, 1966) und OIKAWA (1972) besteht die Möglichkeit mit L-Tyrosin-3,5-T den Anfangsschritt zu erfassen, der durch die Tyrosinase katalysiert wird.



Dabei ist die Menge an gebildetem tritiiertem Wasser proportional der Hydroxylierungsrate. Diese Methode ist ein wenig umständlich, da auf einer Säule TOH von den anderen T-markierten Verbindungen getrennt werden muß.

a. Tyrosinasebestimmung in Teilmengen von Kulturen

Dieser Tyrosinasetest gründet auf dem Prinzip, daß die Bildung von Melanin aus Tyrosin proportional zur Tyrosinaseaktivität ist. Deshalb kann die Melaninsynthese anhand des Einbaus von radioaktivem Tyrosin unter Bedingung eines Substratüberschusses verfolgt werden. Nach Ausfällen des markierten Melanins mit TCA und Wäsche des Praezipitates wird dieses in NaOH gelöst und die Radioaktivität darin bestimmt.

Reaktionspuffer: Phosphatpuffer 80 mM ph 6,8
4 x 10⁻⁴ M L-Tyrosin
4 x 10⁻⁵ M L-DOPA
1 μ Ci L-Tyrosin -¹⁴C / ml
100 E Penicillin + 135 μ g
Streptomycin / ml

Ein Aliquot an zu untersuchenden Zellen (ca. 100 - 200 μ g Protein) wurde bei 37° im Inkubationspuffer über verschiedene Zeiten inkubiert (30', 1h, 2h, 4h, ev. 18h) und die Reaktion nach Zugabe von Albumin als Trägerprotein durch 5%ige TCA (Endkonzentration) gestoppt. Der Niederschlag wurde nach mehrmaliger Wäsche mit 5%iger TCA 3h bei 35° getrocknet. Nach 18 - 24 stündiger Inkubation in 1N NaOH bei RT wurden 0,2 ml der Lösung mit 10 ml Bray versetzt und die cpm im Beckmann Scintillations Counter Modell LS 100 gezählt. Bei Routineuntersuchungen wurde generell jede Probe nur 2h inkubiert.

b. Tyrosinasebestimmung bei ganzen Kulturen

In einigen Experimenten wurden Kulturen mit ^3H L-Leucin (Proteinsynthese) und ^{14}C L-Tyrosin (Protein- und Melaninsynthese) behandelt.

Bei einem erhöhten Einbau von Tyrosin im Vergleich zum Leucin bei behandelten Kulturen weist das auf eine relativ erhöhte Melaninsyntheserate hin.

2.3.3. Photometrische Melanin Bestimmung

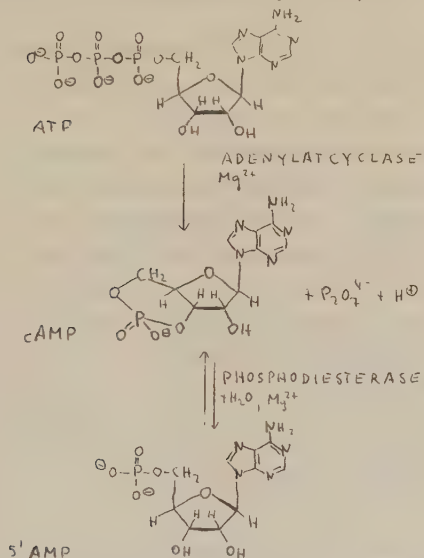
Gelöstes Melanin (in 1N NaOH) zeigt einen von 260 bis 600 nm kontinuierlich abfallenden Absorptionsverlauf (FISCHER, 1969). Da noch vorhandene Proteine oder Nukleinsäuren bei Wellenlängen unter 300 nm die Extinktion erheblich beeinflussen, empfiehlt sich nach HIRSCH (1955) die Extinktion bei 400 nm zu messen. Bei dieser Wellenlänge, aber auch bei niedrigerer (350 nm), besteht eine direkte Proportionalität zwischen Melaninkonzentration und Extinktion (SCHACHTSCHABEL, 1969, 1970).

Bei der Erfassung des intrazellulär vorhandenen Melanins war die geringe Materialmenge unter den Versuchsbedingungen Hauptschwierigkeit. In unserem Labor wurde die photometrische Melaninbestimmung in ganzen Zellkulturen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen wie in 2.1.4.b beschrieben aufgearbeitet und nach der Lösung des Proteins die Extinktion bei 400 nm gegen einen genauso behandelten Blindwert gemessen.

2.4. Bestimmung des cAMP-Gehaltes

Die Synthese des cyclischen Adenosin-3'5'-monophosphats (cAMP) erfolgt unter der Einwirkung der in Zellmembranen menschlicher und tierischer Zellen vorhandenen Adenylatcyclase. Dieses Enzym

katalysiert die intramolekulare Veresterung von ATP zu cAMP unter Abspaltung von Pyrophosphat (BUTCHER u. SUTHERLAND, 1962)



Unter der Wirkung von Phosphodiesterase, die ebenso wie Adenylatcyclase Mg^{2+} abhängig ist, wird cAMP zu 5'AMP abgebaut. Phosphodiesterasehemmer, wie die Methylxanthine Theophyllin, Coffein und Pentiphyllin (1-Hexyl-3,7-dimethylxanthin) (BÜTCHER u. SUTHERLAND, 1962; KREIDLER u. MITARB., 1973; MOLL, 1973; STEFANOVICH u. MITARB., 1974) verhindern den Abbau des cAMP.

Da Nukleotide wie cAMP die Zellmembran nicht oder nur schlecht passieren, wird für Versuche über den cAMP Einfluß auf Zellen im allgemeinen N^6, O^2 - Dibutyryl-cAMP oder ein anderes Derivat eingesetzt, das infolge seiner lipophilen Eigenschaften wahrscheinlich besser in die Zelle eindringen kann (JOHNSON u. PASTAN, 1972).

Zur quantitativen Bestimmung von intrazellulär vorhandenem cAMP wurde der Cyclic AMP Assay Kit der Firma Amersham, Braunschweig verwendet. Der Test

beruht auf der Konkurrenz zwischen nicht markiertem (in der Zelle vorhandenem) cAMP und einer genau definierten Menge an tritiummarkiertem cAMP um ein cAMP bindendes Protein.

Bei vorhandenem "kaltem" cAMP blockiert dieses die Bindung von ^3H cAMP, wobei diese Konkurrent stöchiometrisch verläuft. Bei Versetzen des Inkubationsansatzes mit Kohle wird alles nicht ans Protein gebundene cAMP absorbiert. Nach dem zentrifugieren bleibt im Überstand solcher Proben, die kaltes cAMP enthielten, weniger ^3H cAMP-Protein übrig. Die gemessene Radioaktivität erlaubt eine genaue quantitative Aussage über den cAMP-Gehalt von 0,2 - 16pmol/Probe.

Aufgearbeitet zur cAMP-Bestimmung wurden die Zellen folgendermaßen:

Dekantieren des Mediums

3 x Waschen der Zellen mit ES + Theophyllin (10^{-2}M)

kurz in der Kälte abtropfen lassen

Zellen in 2 ml Aethanol + Theophyllin 10^{-2}M abkratzen

Flaschen mit 1 ml Aethanol + Th 10^{-2}M nachspülen

Aethanol vereinigen

Aliquot für Tyrosinase-Bestimmung abnehmen

Rest sonicieren, 1' Stufe 3, Sonicator:

Sonifer B 12 (Branson Sonic Power Comp., Danbury, Ct, USA)

3 min in heißem Wasserbad (80°) extrahieren
abzentrifugieren

Sediment noch einmal extrahieren

Überstände vereinigen

Anteil für Proteinbestimmung abnehmen

Rest am Rotationsverdampfer eindampfen

Rückstand in Test-Kid-Puffer aufnehmen und
in Test einsetzen.

2.5. Einfluß verschiedener Agenzien auf HPM-Zellen

2.5.1. Sauerstoff

Da Sauerstoff für die Hydroxylierung von Tyrosin essentiell ist, kann man von der Überlegung ausgehen, daß eine in vitro nicht maximale Melaninsynthese auf mangelndes Sauerstoffangebot zurückzuführen ist. Deshalb wurden die Melanomzellen nach dem Mediumwechsel über verschieden lange Zeiträume mit einer sehr hohen Sauerstoffkonzentration begast.

Gasgemisch: 93 % O_2
7 % CO_2 (Fa. Messer-Griesheim,
Dillenburg)

In Gegenwart dieses Gasgemisches wurden der Glukoseverbrauch und die Laktatbildung im Medium untersucht.

2.5.2. Stickstoff

Unter Ausschluß von Sauerstoff dürfte keine direkte aerobe Oxidation von Tyrosin zum DOPA mehr stattfinden. Zur Überprüfung wurden die HPM 73 Zellen 4 und 8 Tage lang unter einer Stickstoffatmosphäre gehalten.

Gasgemisch: 93 % N_2
7 % CO_2 (Fa. Messer-Griesheim,
Dillenburg)

2.5.3. DOPA

Wie schon erwähnt, ist DOPA selbst als Wasserstoffdonator an der Tyrosinasereaktion beteiligt. Beim Tyrosinaseenzymtest wird DOPA stets zum Inkubationsansatz zugegeben, um eine lag-Phase in der Enzymreaktion auszuschließen. Der Einfluß von DOPA

wurde mit Konzentrationen von 10^{-5} und 5×10^{-5} M im Nährmedium geprüft.

2.5.4. Kupferionen

Möglicherweise ist im Medium, das Cu^{2+} nur in Spuren enthält, zuwenig von diesem Schwermetall vorhanden, um eine optimale Reaktion der kupferhaltigen Tyrosinase zu gewährleisten.

Unter dieser Vorstellung wurde $\text{Cu}^{2+} 10^{-6}$ M im Nährmedium angewendet und sein Einfluß auf die Melaninbildung geprüft.

2.5.5. DOPA und Kupferionen

Die Kombination der beiden Substanzen wurde angewendet mit DOPA 10^{-5} M und $\text{Cu}^{2+} 10^{-6}$ M. Hierbei wurde die niedrigere DOPAKonzentration gewählt, da SCHACHTSCHABEL (1969, 1970) fand, daß die Kombination von Cu^{2+} und DOPA früher toxisch wirkt als DOPA alleine.

2.5.6. Tyrosin

Tyrosin muß als Substrat für die Tyrosinasereaktion in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen, um die maximale Wirkung zu erreichen. Die Angaben über die Michaelis-Konstante gehen von 3×10^{-4} bis 8×10^{-4} (BERGMEIER, 1970; HANDBOOK of BIOL. DATA 1956; POMERANTZ, 1966)

Im BME ist Tyrosin nur in Konzentration von $18 \text{ } \mu\text{g/ml} = 10^{-4}$ M vorhanden. Wir erhöhten die Tyrosinkonzentration auf 4×10^{-4} und prüften den Melaningehalt nach mehrtägiger Inkubation.

2.5.7. Theophyllin und dibutyryl-cAMP

Von Stammlösungen dieser Agenzien in serumfreiem Medium wurde den Kultur Nährmedien soviel zugegeben, daß Konzentrationen von 10^{-4} , 5×10^{-4} und 10^{-3} M für dibutyryl cAMP und 5×10^{-4} und 10^{-3} M für Theophyllin (Fa. Pharmazentrale, Herdecke) erreicht wurden.

2.5.8. Verschiedene Serumkonzentrationen

Der Einfluß des Serumgehaltes in Medium auf die Melanin-, DNS- und Proteinsynthese wurde mit Serumkonzentrationen von

- a) 0 %
- b) 0,5 %
- c) 2 %
- d) 20 %
- e) 30 %

im Vergleich zum Kontrollmedium mit 10% Serum überprüft.

Um festzustellen, ob ein eventuell im Serum vorhandener Inhibitor der Melaninsynthese dialysierbar ist (DAVIDSON u. YAMAMOTO, 1968), wurde ein Experiment mit dialysiertem foet. Kalbsserum durchgeführt.

Es wurde auch getestet, ob die Melaninbildung verschieden beeinflusst wird durch foet. Kalbsserum oder durch Kalbsserum.

2.5.9. Choleratoxin und Gangliosid

Choleratoxin (Fa. Behring, Marburg) und Gangliosid G 1 und G 3⁴⁾ wurden allein oder in Kombination in

4) Herrn Prof. H. Wiegandt, Universität Marburg, Physiol. Chem. Inst. I danke ich für die freundliche Überlassung der Ganglioside G1 und G3.

Konzentrationen von $1 \mu\text{g/ml}$ Choleratoxin und $20 \mu\text{g/ml}$ Gangliosid getestet. Es wurden dabei sowohl Kulturen mit Serum (10%) als auch solche ohne Serum im Kulturmedium verwendet.

2.5.10. MSH

Melanocyten-stimulierendes-Hormon ist eine Sammelbezeichnung für 2 Peptidhormone, die im Hypophysenzwischenlappen gebildet werden (BURGER, 1963). Man unterscheidet α -MSH, ein lineares Polypeptid mit 13 Aminosäuren, das in allen Säugetieren gleich ist, und β -MSH mit 22 Aminosäuren, das speciesabhängige Unterschiede in der Sequenz aufweist (BENNETT u. MITARB., 1974). Teile der Sequenz sind identisch mit der von ACTH (LEE u. MITARB., 1963). Um den Einfluß von MSH auf unsere HPM 73 Zellen zu kontrollieren, wendeten wir α -MSH und β -MSH⁵⁾ an in Konzentrationen von 0,1, 10, 100 und 1000 ng pro ml in 10% serumhaltigem, 0,5% serumhaltigem und serumfreiem Nährmedium. Außerdem wurden 200 ng α -MSH/ml in serumfreiem und in serumfreiem Medium mit 0,2% Albumin getestet.

2.5.11. Resochin

Von Resochin ($\bar{7}$ - Chlor-4-(4' Diaethylamino-1' methylbutylamino) chinolin) = Choroquin weiß man (BEDOYA, 1970; SAMS, 1967), daß es nach Langzeittherapie (Malaria) beim Menschen ein Hellerwerden der Haare und Pigmentveränderungen der Haut (DALL u. KEANE, 1959) bewirken kann. Andererseits konnte DALE (1965) zeigen, daß es unter Chloroquin beim Kaninchen zur Pigmentzunahme

5) Von Herrn Dr. C.W.Rittel, Fa. Ciba-Geigy, freundlicherweise Herrn Professor D. Schachtschabel zur Verfügung gestellt.

im Pigmentepithel und der Choroidea kam.

Wir testeten die Wirkung von Resochin (Fa. Bayer, Leverkusen) an HPM 73 Zellen in Konzentrationen von 10^{-5} und 10^{-6} M und in Kombination mit Theophyllin und cAmp je 5×10^{-4} M.

2.6. Einfluß von Melanosomen, Melanin und Tyrosinase auf HPM Zellkulturen

2.6.1. In vivo Markierung und Isolierung von Melanosomen

Einer ♀ 30g schweren, weißen NMRI Maus mit einem HP Melanom von etwa 10 g wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 0,5 ml einer Lösung intraperitoneal injiziert, die pro ml $430 \mu\text{g } ^{14}\text{C-Tyrosin}$ $10 \mu\text{Ci}$ in ES H 3.5 enthielt.

BLOIS u. KALLMANN (1964) konnten zeigen, daß auf diese Weise radioaktives Tumorgewebe erzeugt werden kann.

Am 4. Tag wurde die Maus getötet, und aus dem Melanom die Melanosomen nach der Methode von SEIJI u. MITARB., (1963) präpariert.

Dazu wurde 1 Teil Gewebe aus dem Inneren des Melanoms sofort in 8 Teilen 0,25 M Sucrose (+ 10^{-3} M Ca Cl_2) zwanzigmal bei 0° homogenisiert im Potter mit Teflonstempel (Fa. Braun, Melsungen) und in der Kühlzentrifuge UJ IV KS mit Hochgeschwindigkeitsaufsatz (Fa. Heraeus-Christ, Osterode) 10 Minuten bei 700 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde bei 11 000 g 10 Minuten zentrifugiert, das Sediment in isotoner Sucrose-lösung resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation, diesmal bei 15 000 g, die Überstände vereinigt. Das resultierende Sediment wurde in 0,25 M Sucrose aufgenommen und auf einen 18 h vorher gegossenen

hohen Dichtegradienten gegeben (1,5-2,6 M Saccharose). Nach 1 stündiger Zentrifugation bei 103 000 g in der Ultrazentrifuge L2 - 65K, Rotor SW 65 LTi (Fa. Beckmann, München), wurde der Gradient genau nach der Literaturangabe in 5 Fraktionen unterteilt. Die untersten 0,5 ml des Gradienten (=Fraktion 5) wurden mit 6,2 ml serumfreiem Medium versetzt, das zusätzlich 35 000 IE Polymyxin B Pfizer / 6,2 ml enthielt. Dies ergab die Melanosomensuspension.

2.6.2. Verteilung der Radioaktivität im Protein- und Melaninanteil der Melanosomen

Um festzustellen, wieviel ^{14}C -Tyrosin in das Melanin und wieviel in das Matrixprotein der Melanosomen eingebaut war, wurde wie folgt vorgegangen: 0,5 ml Melanosomensuspension wurden abzentrifugiert und die Melanosomen gewaschen mit

2 x 2 ml ES

2 x 2 ml 5% TCA

3 x 2 ml 96% Aethanol

Nach dem Trocknen wurden die Melanosomen in 6 N HCl bei 105° unter Stickstoffatmosphäre 19 h hydrolysiert. Anschließend wurde zentrifugiert, das Melaninsediment 2 mal mit 10^{-2} N HCl und 1 mal mit 96% Aethanol gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden 4 h lyophilisiert.

Melanin und lyophilisiertes Proteinhydrolysat wurden 18 h mit 1N NaOH bei RT inkubiert. Dann wurde von den Proben die E₄₀₀ gemessen, eine Proteinbestimmung (Lowry) gemacht und die Radioaktivität bestimmt.

2.6.3. Markierung isolierter Melanosomen in vitro und Bestimmung des Tyrosineinbaus

Eine melanomtragende Maus wurde getötet und das Melanom genau wie unter 2.6.1. beschrieben, aufgearbeitet, bis das Sediment nach der 1j 000 g Zentrifugation vorlag. Dieses Sediment wurde in 5 ml Phosphatpuffer, der 4×10^{-4} M L-Tyrosin ($1 \mu\text{Ci/ml}$) und 4×10^{-5} M L-DOPA und Penicillin und Streptomycin enthielt, bei 37° 18 h lang inkubiert. Zur Bestimmung der Radioaktivität in den Melanosomen wurden nach 1, 2, 5 und 18 h jeweils 2×100 1 vom Inkubationsansatz abgenommen, mit $50 \mu\text{l}$ einer 3% Albuminlösung als Trägerprotein versetzt, die säureunlöslichen Bestandteile mit 10% TCA gefällt und nach mehrmaliger Wäsche mit je $200 \mu\text{l}$ 5% TCA 3 h bei 37° getrocknet.

Zu jeder Probe wurde 0,5 ml 1N NaOH gegeben. Nach 18 stündiger Inkubation wurden sie mit der Halbmikrospitze des Sonicators Sonifer B 12 (Branson Sonic Power Company, Danbury, Conn. USA) 1 Minute bei Stellung 4,5 soniciert, um die noch nicht gelösten Partikel möglichst zu zerkleinern und fein zu verteilen. Zum Schluß wurde die Radioaktivität bestimmt (siehe 2.7.3.).

Nach der 18 stündigen Inkubation wurden die markierten Melanosomen zur weiteren Reinigung und Anreicherung abzentrifugiert (15000 g) und nach 2-maligem Waschen mit 2 ml 0,25 M Saccharose ($+10^{-3}$ M CaCl_2) in 1 ml dieser Lösung resuspendiert. Diese Suspension wurde, wie in 2.6.1. beschrieben, auf einem Saccharosedichtegradienten (1,5 M - 2,6 M) getrennt und nach der Zentrifugation die Fraktion 5 (siehe 2.6.1.) mit 10 ml serumfreiem Medium + 60 000 IE Polymyxin B (Fa. Pfizer, Karlsruhe) versetzt. Anteile dieser markierten Melanosomensuspension wurden den Kulturen zugesetzt.

2.6.4. Elektronenmikroskopie der Melanosomen- präparation

Zur Untersuchung auf Reinheit der Präparation wurde Fraktion 5 aus dem hohen Dichtegradienten (siehe 2.6.1.) mit 9 Teilen H_2O versetzt und 20' $4^{\circ}C$ bei 100000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Fixierung der Melanosomen erfolgte mit Glutaraldehyd/ OsO_4 . Fixierung, Schnitte und Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Dr. R. Marx, Universität Marburg, Phys.Chem.Inst. durchgeführt.

2.6.5. Herstellung von radioaktivem Melanin

Ein nach 2.6.1. hergestelltes Sediment (bei 11000 g zentrifugiert) von Melanosomen und Mitochondrien wurde nach 18 h Inkubation in Tyrosinasereaktionspuffer (siehe 2.3.2.a.) bei 15000 g zentrifugiert und einer Proteinhydrolyse in 6N HCl bei 105° unter N_2 20 h lang unterworfen.

Nach der Hydrolyse wurde der Ansatz 5 min lang mit der Halbmikrospritze des Branson Sonicators bei Stellung 6 soniciert, das Melanin abzentrifugiert, 2 x mit 10^{-2} N HCl und 1 x mit Äthanol (96%) gewaschen.

Das getrocknete ^{14}C -markierte Melanin wurde in 3 ml serumfreiem Medium + 15000 IE Polymyxin B suspendiert und als Melaninsuspension den HPM 73 Zellen im Experiment zugesetzt (0,1 ml/10 ml Kulturmedium). Die Melaninpartikel hatten einen Durchmesser von ca. $1\mu m$.

2.6.6. Inkubation von HPM Kulturen mit Melanosomen, Melanin und Tyrosinase

Die Aufnahme von Melanosomen durch die HPM-73 Zellen wurde geprüft durch Inkubationen bei 37° über Zeiträume von 1 h bis zu 8 Tagen mit 0,1 ml Melanosomensuspension/10 ml Medium. Es wurde sowohl Medium mit 10% als auch mit 0% Serumgehalt verwendet.

Zusammen mit Melanosomen wurden in einigen Experimenten Actidion (Fa. Upjohn, Heidelberg) in Konzentrationen von 0,2 und 1 μ g/ml Nährmedium oder 10⁻⁴M 2,4-Dinitrophenol (Fa. Roth, Karlsruhe) zugesetzt, um die Melanosomen-Aufnahme bei inhibierter Proteinsynthese (Actidion) und entkoppelter Atmung (Dinitrophenol) zu studieren.

Die Melaninaufnahme wurde über eine Stunde, 3 und 5 Tage verfolgt durch Zugabe von 0,1 ml Melaninsuspension/Kultur (10 ml Medium).

Nach der Angabe von SEIJI (1963) sind im Überstand nach der Zentrifugation bei 11 000 g (siehe 2.6.1.) noch einige weniger melanisierte Melanosomen und viel an Ribosomen gebundene und nicht partikelgebundene Tyrosinase vorhanden. Der Einfluß dieser, den Kulturen zugesetzten "Tyrosinase" (0,5 ml/10 ml Kulturmedium) auf die Melaninsynthese wurde über verschieden lange Inkubationszeiten getestet.

Der Überstand wurde vorher mit der üblichen Antibiotika (Penicillin, Streptomycin, Polymyxin) versetzt.

In weiteren Experimenten über den Einfluß von löslicher, partikelfreier Tyrosinase wurde den Kulturen ein Überstand zugesetzt, der vorher eine Stunde bei 103 000 g zentrifugiert worden war, um noch vorhandene partikelgebundene Tyrosinase zu entfernen.

2.7. Bestimmung von DNS- und Proteinsynthese mit Hilfe radioaktiv markierter Vorstufen

In den Experimenten wurde die DNS-, die Protein- und teilweise auch die Melaninsynthese bei Kontrollkulturen und bei behandelten Kulturen anhand des Einbaus von radioaktivem Thymidin, Leucin und Tyrosin in die TCA-unlösliche Zellfraktion verfolgt. Dazu wurden Lösungen dieser radioaktiven Substanzen jeweils 18 - 24 h vor Experimentende den Kulturen zugesetzt, die vorher mit frischem Nährmedium versetzt worden waren. Die Zugabe und Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 37°.

2.7.1. Konzentrationen der radioaktiven Substanzen im Kulturmedium

Folgende Substanzen wurden in den angegebenen Konzentrationen (Angaben pro 10 ml Medium) jeweils in 0,2 ml serumfreiem Medium den Kulturen zugesetzt:

Thymidin-2-¹⁴C : 0,2 μ Ci (48 μ g)

Thymidin-methyl-³H: 2 μ Ci (48 μ g)

L-Leucin-4,5-³H: 1 μ Ci

L-Tyrosin-U-¹⁴C: 0,2 μ Ci

L-Tyrosin-3,5-³H: 0,5 μ Ci

2.7.2. Aufarbeitung der Kulturen

Die Kulturen wurden nach der Inkubation wie folgt aufgearbeitet:

Dekantieren des Mediums (die Zellen bleiben dabei an der Glaswand haften)

4 x Waschen mit je 10 ml Earle's Salzlösung (0°), jeweils 30 Sek.

2 malige Extraktion mit 10 ml 5% Trichloressigsäure (0°) jeweils 5 Minuten

4 x Waschen mit 10 ml 96% Aethanol (0°), jeweils 2 Minuten

Zum Trocknen wurden die Flaschen, mit der Öffnung nach unten, 24 h bei Zimmertemperatur aufgestellt. Dann wurde der Zellrückstand mit 1,2 ml 1 N NaOH 18 - 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Aliquote Anteile wurden zur Bestimmung des Proteingehaltes (siehe 2.1.4.b.), der Extinktion bei 400 nm und der Radioaktivität verwendet.

2.7.3. Bestimmung der eingebauten Radioaktivität

0,2 ml des in 1 N NaOH gelösten Zellrückstandes wurde mit 10 ml Bray Scintillationsflüssigkeit vermischt. Zum Abklingen der nicht durch Radioaktivität verursachten Fluoreszenz (Eigenfluoreszenz) wurden die Proben 24 h im Scintillationszähler Fa. Beckmann, Modell LS 100 aufbewahrt, ehe die Radioaktivität 3mal gemessen wurde (20 Minuten, Fehlerbreite 1%). Vom Mittelwert der Einzelmessungen wurde der Leerwert abgezogen (0,2 ml 1 N NaOH/10ml Bray). Es wurde auch überprüft, ob die "braune" Farbe von gelöstem melaninhaltigem Zellrückstand einen Einfluß auf die Zählausbeute hat. Dabei wurde gefunden, daß Lösungen bis zu einer Extinktion bei 400 nm von 1,8/ml nicht stärker gequenchet werden als durch reine NaOH.

Scintillationsflüssigkeit (BRAY, 1960):

Aethylenglykoll 20,0 g

Naphtalin 60,0 g

Methanol 100,0 ml

DimethylPOPOP 0,2 g

PPO 4,0 g

Dioxan ad 1000 ml

3. Ergebnisse

3.1. Chromosomenanalyse

Im diploiden Chromosomensatz einer somatischen Mäusezelle sind normalerweise 40 Chromosomen zu finden. Im Gegensatz dazu zeigen die HP -Melanomzellen eine starke Streuung der Zahl der Chromosomen. Es kommen Zahlen von 40 - 180 pro Metaphase vor, wobei die Verteilungskurve der HPM-67 Zellen ein Maximum bei 60 Chromosomen aufweist (SCHACHTSCHABEL, 1970; SCHACHTSCHABEL u. FISCHER 1972), das entspricht einem triploiden Chromosomensatz.

Auch die Chromosomenanalyse der HPM-73 Zellen zeigt einen abnormalen Chromosomensatz von etwa 60 Chromosomen pro Metaphase. Ferner unterscheidet sich die Morphologie der HPM Chromosomen deutlich von derjenigen einer Normalzelle. Während in der Normalzelle sämtliche Chromosomen telo- oder akrozentrisch (d.h. hufeisenförmig) sind, finden sich bei den Melanomzellen auch metazentrische und submetazentrische Chromosomen (etwa 30-40% der insgesamt vorhandenen). Besonders auffällig ist das im allgemeinen einmal vorkommende subtelozentrische Chromosom, das als "Marker"-Chromosom der HPM-Zellen angesehen werden kann. In hexaploiden Chromosomensätzen sind meist 2 dieser "Marker"-Chromosomen zu finden.

Chromosomenanalysen der HPM-67 und HPM-73 Zellen wurden in regelmäßigen Abständen (etwa alle 4-6 Monate) während der in-vitro-Kultivierung durchgeführt. Dabei konnte keine signifikante Abweichung (sowohl in Anzahl als auch Gestalt der Chromosomen) mit steigendem Alter festgestellt werden. Polyploide Sätze traten mit einer Häufigkeit von 5-10% auf. Es hat den Anschein, daß bei den HPM-73 Zellen im Vergleich zu HPM-67 Zellen die Zahl der höheren Ploidien leicht erhöht ist.

3.2. Zellwachstum und Bestimmung einiger Zellkomponenten

3.2.1. Proteingehalt und Verdopplungszeit

Im Laufe der in-vitro-Kultivierung wurden von HPM-Kulturen in regelmäßigen Abständen die Verdopplungsgeschwindigkeit ("Wachstumskurven") bestimmt. Dabei wurde wegen methodischer Schwierigkeiten der Zellzahlbestimmung (schwer identifizierbare verzweigte Zellen) die Vermehrung des durchschnittlichen Proteingehaltes pro Kultur während der exponentiellen Wachstumsphase in Abhängigkeit von der Inkubationszeit gemessen.

Bei den HPM-73 Zellen ergab sich im ersten Jahr der in-vitro-Kultivierung eine Verdopplungsgeschwindigkeit von 150-180 Stunden. Im Laufe des zweiten Jahres in vitro trat eine Tendenz zu schnellerem Wachstum auf; die Verdopplungszeiten verringerten sich auf etwa 100h.

Die gleiche Beobachtung trifft für HPM-67 Zellen zu. FISCHER (1969) berichtet über eine durchschnittliche Verdopplungszeit von etwa 110h in den Jahren 67 - 69. Diese Zellen aus dem gleichen Zellstamm verdoppeln sich heute (1975) innerhalb von ungefähr 40h.

Typische Wachstumskurven sind in Abb. 7 angegeben.

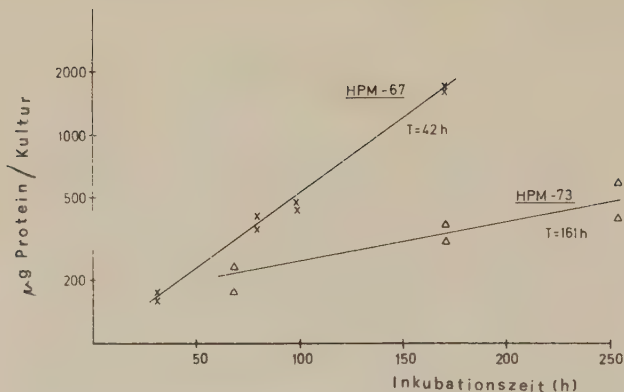


Abb. 7: Wachstumskurven von 2 Linien des HARDING-PASSEY-Melanoms in Monolayerkultur.

3.2.2. RNS-, DNS- und Proteingehalt

Bezogen auf 1 mg Protein finden sich in den HPM-Zellen 98 µg RNS; das sind $17,8 \mu\text{g}/10^6$ Zellen. Der DNS Gehalt liegt bei 39 µg/mg Protein oder $7,1 \mu\text{g}/10^6$ Zellen.

Der Proteingehalt pro 10^6 Zellen beträgt 181 µg.

3.2.3. Melaningehalt

Die HPM-73 Zellen haben die Fähigkeit zur intensiven Melaninsynthese bisher in vitro beibehalten, während sie bei den HPM-67 Zellen stark zurückgegangen ist. Bei dicht bewachsenen Kulturen, die nur noch eine geringe DNS-Synthese zeigen, nimmt die Melaninsynthese zu (FISCHER, 1969). Bei solchen "stationären" Kulturen ist der Melaningehalt der HPM-73 Zellen etwa 5 mal höher als bei HPM-67 Zellen (Tab. 1)

<u>Zellen</u>	<u>Melaningehalt</u> <u>E₄₀₀/mg Protein</u>	<u>mg Protein/Kultur</u>
HPM-67	0,264 $\pm$ 0,009	5,1 $\pm$ 0,1
HPM-73	1,33 $\pm$ 0,01	4,19 $\pm$ 0,01

Tab. 1: Unterschiede im Melaningehalt von "stationären" HPM-67 und HPM-73 Kulturen.

3.3. Zellstoffwechsel

3.3.1. Glukoseverbrauch und Laktatbildung

Zellkulturen zeigen das Phänomen der aeroben Glykolyse, d.h. ein Großteil der Glukose wird in Gegenwart von Sauerstoff nicht vollständig zu CO₂ und H₂O "verbrannt", sondern als Laktat ins Nährmedium abgegeben. Die aerobe Glykolyserate ist sehr unterschiedlich bei verschiedenen Zellarten.

Der Glukoseverbrauch und die Laktatbildung von HPM-67 und HPM-73 Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während des exponentiellen Wachstums bestimmt und in Abbildungen 8 und 9 aufgetragen. Dabei ergibt sich, daß HPM-67 Zellen einen logarithmischen Anstieg des Glukoseverbrauches und der Laktatbildung aufweisen. Diese exponentielle Zunahme dieser Parameter ist bei den HPM-73 Zellen schwächer ausgeprägt, was wahrscheinlich auf die langsame Wachstumsgeschwindigkeit zurückzuführen ist.

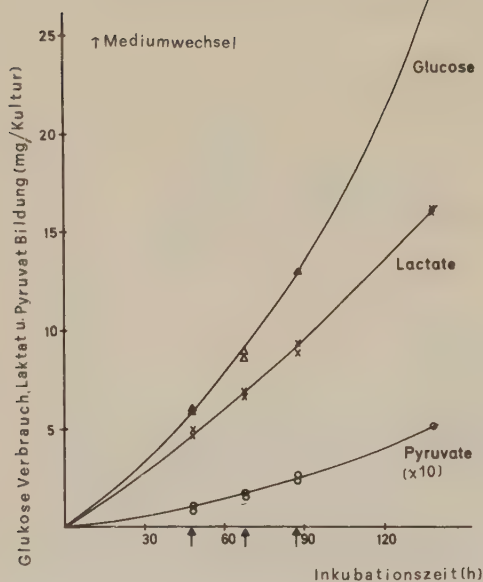


Abb. 8: Glukoseverbrauch und Bildung von Laktat und Pyruvat von HPM-67 Zellen in Monolayer-Kultur.

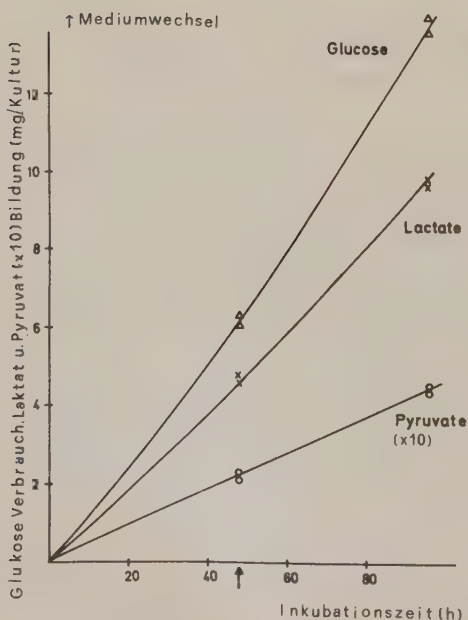


Abb. 9: Glukoseverbrauch und Bildung von Laktat und Pyruvat von HPM-73 Zellen in Monolayer-Kultur.

Wenn der Glukoseverbrauch (bzw. die Laktatbildung) in Beziehung zu dem in der Kultur vorhandenen zellulären Proteingehalt gesetzt wird, ergaben sich für HPM-67 und HPM-73 Kulturen ähnliche Glykolyseraten. So betrug der Glukoseverbrauch pro mg Protein und Stunde (bei 37°) für beide Zellarten etwa 300 μ g und die Laktatbildung unter den gleichen Bedingungen etwa 220 μ g (Tabelle 2).

Zellen	Glukose	Laktat	Pyruvat	Molarer Quotient	
	$\frac{\mu\text{g}}{\text{mg Prot.}/\text{h}}$	$\frac{\mu\text{g}}{\text{mg Prot.}/\text{h}}$		$\frac{\text{Laktat}}{\text{Glukose}}$	$\frac{\text{Pyruvat}}{\text{Glukose}} \times 100$
HPM-67	333 $\pm$ 131 (n = 10)	237 $\pm$ 125 (n = 10)	7,1 $\pm$ 3,8 (n = 9)	1,42	4,2
HPM-73	272 $\pm$ 65 (n = 13)	196 $\pm$ 48 (n = 13)	6,5 $\pm$ 4,0 (n = 13)	1,44	4,7

Tab. 2: Glukoseverbrauch und Bildung von Laktat und Pyruvat von HPM-67 und HPM-73 Zellen in Monolayer-Kultur.

Da in späteren Experimenten der Einfluß des Serumgehaltes des Nährmediums auf die Melaninsynthese gemessen werden sollte (siehe 3.5.7.), war von besonderem Interesse, ob unter Bedingungen eines serumfreien oder serumarmen (0,5%) Mediums die Glykolyserate Veränderungen unterliegt, insbesondere weil für viele Zellkulturen Serum zum Wachstum essentiell ist und sie unter serumfreien Bedingungen zum Absterben neigen.

Die Messung der Glykolyserate von HPM-Kulturen in serumfreiem oder 0,5% serumhaltigem Medium ergab, daß der Quotient Laktat/Glukose während einer Inkubationszeit von bis zu 4 Tagen sich nicht wesentlich änderte.

3.3.2. Pyruvatbildung

Außer Laktat wurde von HPM-Kulturen auch Pyruvat gebildet und ins Medium abgegeben. Die Bildung von Pyruvat war jedoch im Vergleich zu der von Laktat bedeutend geringer.

Sie lag bei etwa $7 \mu\text{g}/\text{mg Protein/h}$. (siehe Abb. 8 und 9)

3.3.3. Verbrauch und Bildung von Aminosäuren

Quantitative Bestimmung des Aminosäuregehaltes im Nährmedium über eine längere Inkubationszeit ergab, daß nahezu alle Aminosäuren im Medium abnahmen, während der Alanin- und Asparaginsäuregehalt zunahm. In Tabelle 3 ist der Gehalt einiger Aminosäuren im Nährmedium nach 1 tägiger Inkubation aufgeführt.

Aminosäure $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$ Medium	Kontrolle	HPM-67	HPM-73
Alanin	132 (100%)	209 (158%)	285 (216%)
Asparagin- säure	29 (100%)	44 (151%)	54 (186%)
Valin	234 (100%)	192 (82%)	180 (77%)
Methionin	80 (100%)	58 (73%)	51 (64%)
Isoleucin	248 (100%)	199 (80%)	168 (68%)
Leucin	265 (100%)	205 (77%)	186 (70%)

Tab. 3: Veränderungen der Konzentration einiger Aminosäuren im Nährmedium von HPM-67 und HPM-73 Monolayer-Kulturen. Durchschnittliche Proteinzunahme während der Inkubationszeit: HPM-67 : $225 \mu\text{g}$, HPM-73 : $240 \mu\text{g}$. Inkubationszeit: 19 h.

Aus dem Quotienten von gebildetem Alanin zu verbrauchter Glukose läßt sich ableiten, daß die Alaninbildung pro Mol Glukose bei HPM-67 Zellen etwas

höher liegt als bei HPM-73 Zellen (Tabelle 4).

<u>Molarer Quotient</u>	<u>HPM 67</u>	<u>HPM 73</u>
Laktat Glukose	$1,42 \pm 0,2$ (n = 10)	$1,44 \pm 0,2$ (n = 18)
Pyruvat Glukose x 100	$4,2 \pm 1,3$ (n = 8)	$4,7 \pm 1,7$ (n = 17)
Alanin Glukose x 100	$3,6 \pm 1,4$ (n = 3)	$1,56 \pm 0,2$ (n = 3)

Tab. 4: Molarer Quotient von Laktat-, Pyruvat- und Alaninbildung und Glukoseverbrauch bei exponentiell wachsenden HPM-67 und HPM-73 Kulturen.

3.4. Bestimmungen der Tyrosinaseaktivität

Die gebräuchlichsten Verfahren zur Bestimmung der Tyrosinaseaktivität beruhen auf dem Prinzip der Erfassung von tritiiertem Wasser, das bei der Oxidation von 3,5-³H-Tyrosin zu DOPA unter Tyrosinaseeinwirkung gebildet wird. (POMERANTZ, 1964), auf der Messung des Einbaus von radioaktiven Tyrosin ins Melanin (CHEN und CHAVIN, 1965) oder auf der fluorometrischen Bestimmung des aus Tyrosin gebildeten DOPAs (ADACHI und HALPRIM, 1967). Nach allen drei Verfahren wurde die Tyrosinasebestimmung in unserem Labor durchgeführt. In meiner Arbeit habe ich die Tests nach CHEN und CHAVIN (1965) und ADACHI und HALPRIM (1967) angewandt.

3.4.1. Fluorometrische Tyrosinasebestimmung

Bei der Bestimmung der Tyrosinase nach dem Test von ADACHI und HALPRIM (1967) (siehe 2.3.1.) ergaben sich einige grundlegende Schwierigkeiten. Nach Bereiten der Enzymlösung und Herstellung von Verdünnungen mit Enzymkonzentrationen von 1/2 und 1/4 wurde von ADACHI und HALPRIM eine direkte Abhängig-

keit von Enzymkonzentration zu Tyrosinaseaktivität festgestellt. Diese Beziehung konnte in unseren Bestimmungen nicht gefunden werden. Innerhalb der ersten halben Stunde der Inkubation wurde zwar mit steigender Gewebekonzentration auch mehr DOPA gebildet, aber anstatt der zu erwartenden Menge von 4 : 2 : 1 wurde ein Verhältnis von 2 : 1,3 : 1 gefunden. Nach einstündiger Inkubation war im Ansatz mit der meisten Enzymmenge gleich viel DOPA gebildet wie im Ansatz mit der halben Enzymmenge.

Um einen Hinweis zu erhalten, ob die mangelnde Parallelität zwischen Gewebegehalt (Enzymkonzentration) und DOPA-Bildung auch im Falle einer isolierten, gereinigten Tyrosinase zutrifft, wurde unter den gleichen Bedingungen die Reaktion mit Pilztyrosinase durchgeführt (siehe 2.3.1.). In diesem Falle entsprach die DOPA-Bildung nach zehn Minuten etwa den Unterschieden in den Enzymkonzentrationen; allerdings nahm bei längeren Inkubationen der DOPA-Gehalt des 10 E Tyrosinaseansatzes stark ab, während er beim Ansatz mit 1 E auf gleichem Niveau stehen blieb.

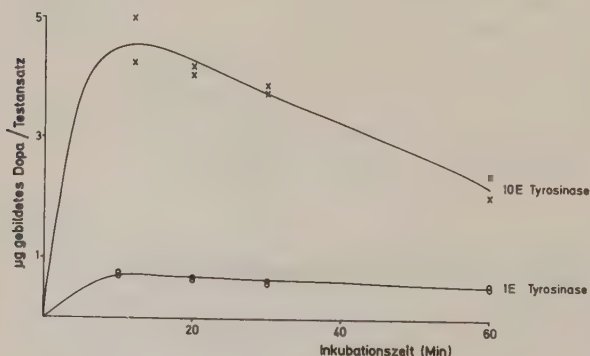


Abb. 10: Veränderungen in der DOPA-Konzentration während der Inkubation mit Pilztyrosinase in Gegenwart von 0,75 mM Ascorbinsäure

Aus letzten Ergebnissen wurde geschlossen, daß im Inkubationsansatz zu wenig Ascorbinsäure vorhanden sein könnte, die ja die Weiteroxydation von gebildetem DOPA zum DOPAchrom verhindern soll. Deshalb wurde der Ascorbinsäuregehalt im Inkubationsansatz auf die doppelte bzw. auf die fünffache Konzentration erhöht. Dabei zeigte sich, daß bei der fünffachen Ascorbinsäuremenge über den gesamten Inkubationszeitraum eine lineare Zunahme des DOPA-Gehaltes, der auch den unterschiedlichen Konzentrationen an eingesetzter Pilztyrosinase entsprach, stattfand.

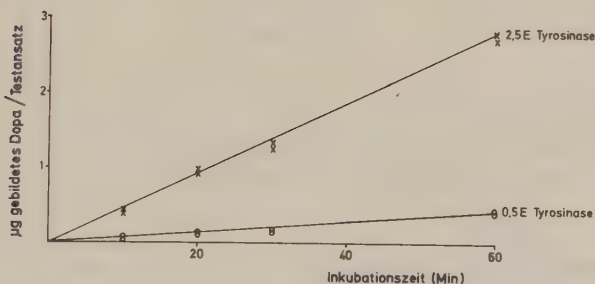


Abb. 11: DOPA-Bildung während der Inkubation mit Pilztyrosinase in Gegenwart von 3,75 mM Ascorbinsäure (nach ADACHI und HALPRIM; jedoch 5fach höhere Ascorbinsäurekonzentration).

Beim Versuch, die Tumortyrosinase-Bestimmung unter den gleichen Bedingungen durchzuführen (5fache Ascorbinsäurekonzentration), ergaben sich neue Schwierigkeiten:

Es bestand keine Proportionalität zwischen Gewebekonzentration und DOPA-Bildung, und die DOPA-Bildung

verlief nicht linear über den Inkubationszeitraum, sondern es zeigte sich eine deutliche Verzögerungsphase (lag-Phase), die mit steigender Gewebeverdünnung (jedoch bei konstanter Ascorbinsäure-Konzentration von 3,75 mM) noch länger wurde.

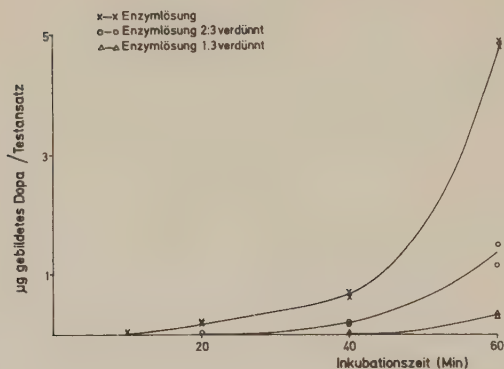


Abb. 12: DOPA-Bildung während der Inkubation von HPM-Tumorgewebe in Gegenwart von 3,75 mM Ascorbinsäure; Bedingungen identisch zu denen von Abb. 11.

Die Kurven gleichen den von ADACHI und HALPRIM beschriebenen für tyrosinhaltige Inkubationsansätze, die kein DOPA als "katalysierendes Cosubstrat" enthalten. (DOPA ist ja als Wasserstoffdonator an der Tyrosinasereaktion beteiligt, siehe 1.) Diese lag-Phase konnte jedoch durch Erhöhung des DOPAGEHALTES auf das Doppelte oder Fünffache nicht verhindert werden. Deshalb entstand die Vermutung, daß ein Inhibitor der Tyrosinase im HP MelanomgewebeanSATZ vorhanden ist, der zuerst inaktiviert werden muß, ehe die DOPA-Bildung linear verlaufen kann. Es stellte sich die Frage, ob Ascorbinsäure selbst den Inkubationsansatz mit Tumortyrosinase inhibiert. Eichkurven (Abb. 13) über die Fluoreszenzintensität

in Abhängigkeit von der DOPA-Konzentration bei verschiedenen Ascorbinsäuregehalten zeigten, daß bei Erhöhung der Ascorbinsäurekonzentration die Fluoreszenzstärke bei gleichen DOPAgehalten stark abnimmt. Die einfachste Erklärung wäre deshalb, daß hohe Konzentrationen von Ascorbinsäure im Test mit der Bildung (Oxydation) der fluoreszierenden Oxydationsprodukte des DOPA (nämlich des 5,6-Dihydroxyindols und der 5,6-Dihydroxyindolcarbonsäure) interferieren.

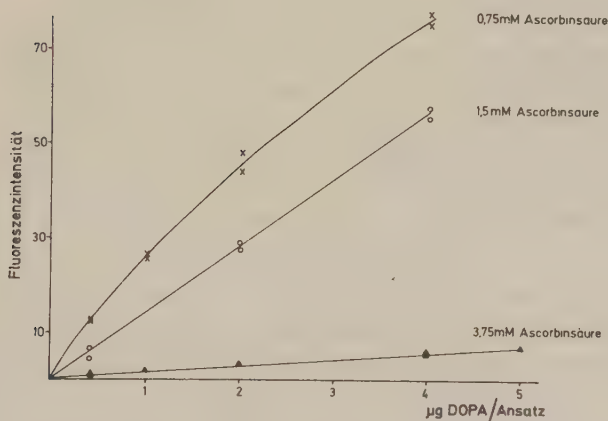


Abb. 13: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der DOPA-Konzentration bei verschiedenen Ascorbinsäuregehalten im Tyrosinasetest nach ADACHI und HALPRIM.

Die sich mit zunehmender Verdünnung des tyrosinasehaltigen Tumorgewebes verstärkende lag-Phase (siehe Abb. 12) läßt sich am einfachsten dadurch erklären, daß eine Ascorbinsäure verbrauchende ("oxydierende") Gewebekomponente ebenfalls verdünnt wird. Da jedoch im Pilztyrosinasesystem bei gleichhoher Ascorbinsäurekonzentration (3,75 mM) eine Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und DOPA-Oxydation

bestand, kann nicht einfach von der Voraussetzung ausgegangen werden, daß Ascorbinsäure die DOPA-Oxydation inhibiert. Deswegen lassen wir uns von der wahrscheinlicheren Arbeitshypothese leiten, daß Ascorbinsäure zusätzlich einen inhibierenden Einfluß auf die Tyrosinase im Tumorgewebe selbst, jedoch nicht auf die isolierte Pilztyrosinase ausübt.

Eine Möglichkeit der Inaktivierung der Tyrosinase durch Ascorbinsäure wäre die Überführung des Tyrosinasesystems in einen reduzierten Zustand. (Ausbildung von proteingebundenen SH-Gruppen) Für eine solche Möglichkeit sprechen in-vitro-Untersuchungen aus der Literatur über einen aktivierenden Einfluß von SH-blockierenden Agenzien (wie Ag^+ , Hg^+ , Cu^{2+}) auf die Tyrosinaseaktivität in Melanomhomogenaten (MENON und HABERMANN, 1970). Eine weitere Möglichkeit wäre, daß im Tumortyrosinasesystem ein Inhibitor vorhanden ist, der durch Reduktion mit Ascorbinsäure aktiviert wird.

Es sei deshalb nochmals darauf hingewiesen, daß dieser Fluoreszenztyrosinasetest von ADACHI und HALPRIM mit großen Nachteilen versehen ist, da im Tumor-Tyrosinase-System keine Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und Fluoreszenzintensität zu erzielen ist, andererseits im Pilztyrosinasetest die angegebene Ascorbinsäurekonzentration nicht ausreicht, um das gebildete DOPA vor der Weiteroxydation zu schützen.

Das verschiedene Verhalten von Pilztyrosinase und Tumortyrosinase gab Anlaß zum Versuch der Kombination dieser beiden Enzyme bei einer fünffachen Ascorbinsäurekonzentration. Dabei ergab sich die interessante Beobachtung, daß in den ersten dreißig Minuten in der Kombination etwa so viel DOPA gebildet wurde, wie auch durch die Addition der einzelnen Enzyme zu berechnen war. Nach 60-minütiger Inkubation

dagegen war die DOPA-Bildung durch die kombinierten Enzyme auf mehr als das Dreifache erhöht (Abb. 14).

Ob dieses Ergebnis darauf beruht, daß in der Kombination der beiden Enzyme ein stärkerer Ascorbinsäureverbrauch stattfindet und damit weniger Ascorbinsäure als "Inhibitor" des Tyrosinasesystems oder der Fluoreszenzbildung zur Verfügung steht, muß noch gezielt untersucht werden.

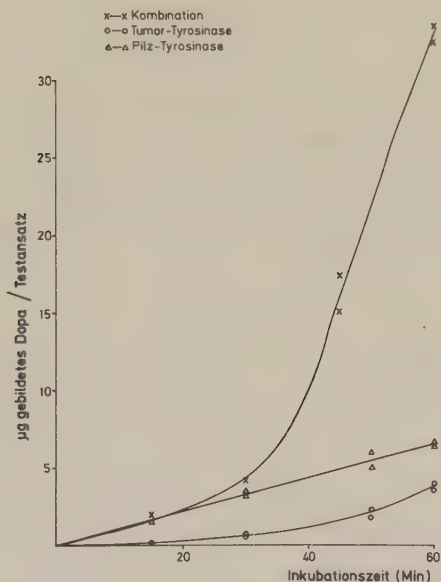


Abb. 14:
Einfluß von Pilz- oder Tumortyrosinase allein oder in Kombination auf die DOPA-Bildung im Tyrosinasetest nach ADACHI u. HALPRIM (jedoch mit 3,75 mM Ascorbinsäurekonzentration.)

3.4.2. Tyrosinasebestimmung mit radioaktivem Tyrosin

Wegen der Nachteile der unter 3.4.1. beschriebenen fluorometrischen Tyrosinasebestimmung und auch wegen der relativ aufwendigen Methodik wurde die in 2.3.2. beschriebene Tyrosinasebestimmung, die auf

dem Prinzip des Einbaus von radioaktivem Tyrosin ins Melanin beruht, routinemäßig durchgeführt. Der Test ist relativ einfach auszuführen und gibt reproduzierbare Ergebnisse.

Das Ergebnis einer typischen Tyrosinasebestimmung in diesem Test ist in Abb. 15 aufgeführt. Über eine Inkubationszeit von 2 h verläuft der Einbau linear und es besteht auch eine relativ genaue Beziehung zwischen Gewebekonzentration (Enzymaktivität) und Einbau von Tyrosin ins Melanin. Wie vergleichende Analysen gezeigt haben, ist der Einbau von Tyrosin ins Protein dieser *in vitro* Ansätze nur geringfügig zum Einbau ins Melanin ($\sim 5\%$). Dieser Test ist nicht im strengen Sinne eine spezifische Tyrosinasebestimmung, weil ja letztlich nicht die DOPA-Bildung sondern das Endprodukt der Melaninbildung gemessen wird. Jedoch darf eine Proportionalität zwischen Tyrosinaseaktivität und Melaninbildung unter *in vitro* Bedingungen angenommen werden.

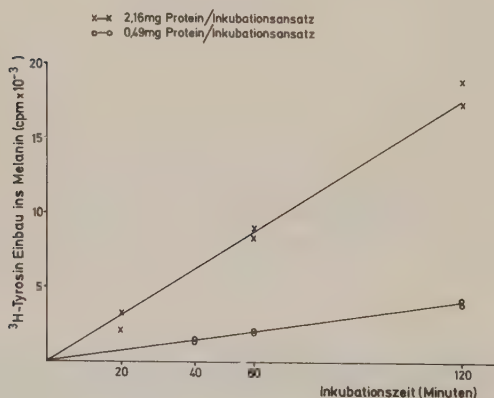
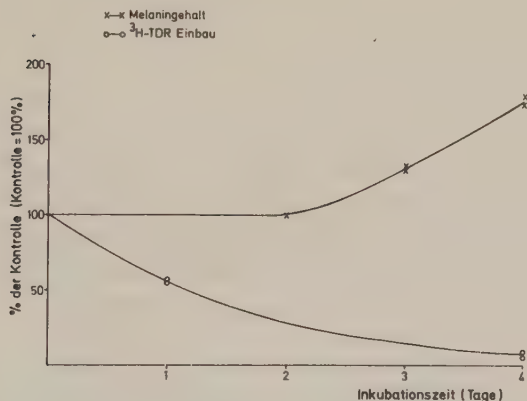


Abb. 15: Einbau von ^3H -Tyrosin ins Melanin eines tyrosinasehaltigen HPM-Gesamtgewebhomogenates

3.5. Versuche zur Stimulierung der Melaninsynthese in HPM-Kulturen

3.5.1. Einfluß von Sauerstoff

Inkubation der HPM Zellen in Gegenwart von 93% Sauerstoff und 7% CO_2 über 8 Tage zeigte in HPM-67 und HPM-73 Zellen unterschiedliche Ergebnisse. Während bei den relativ melaninhaltigen HPM-73 Zellen kein Einfluß auf die Melaninsynthese bestand, kam es bei den relativ melaninarmen HPM-67 Zellen zu einer Erhöhung des Melaningehaltes (Abb. 16). Das Wachstum - gemessen an der Zunahme des Gesamtproteingehaltes - wird bei diesen hohen Sauerstoffkonzentrationen deutlich inhibiert (Abb. 17), was auch durch Messung der DNS Syntheserate bestätigt wurde, die nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen praktisch völlig inhibiert ist (Abb. 16).



• Abb. 16: Einfluß eines Sauerstoff (93%) - CO_2 (7%) Gasgemisches auf Melaningehalt und DNS Synthese bei HPM-67 Monolayer-Kulturen.

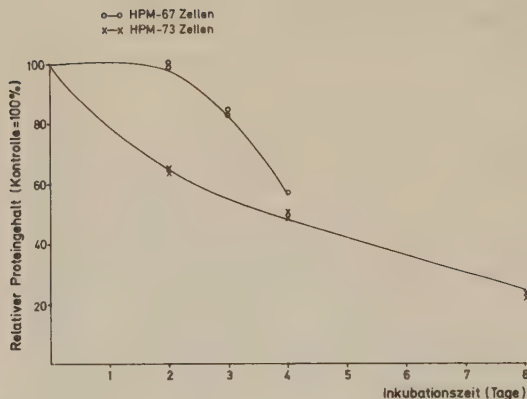


Abb. 17: Einfluß eines Sauerstoff (93%) - CO₂ (7%) Gasgemisches auf den Proteingehalt in HPM-67 und HPM-73 Kulturen.

Andererseits zeigen Messungen des Verbrauchs von Glukose und der Bildung von Laktat, daß die Zellen auch nach 8 Tagen noch nicht vollständig abgestorben sind. Der Glukoseverbrauch pro Kultur nimmt zwar ab, was wahrscheinlich auf die inhibierte Zellproliferation zurückzuführen ist (Abb. 17), aber es kommt zu einer relativ erhöhten Laktatbildung, die nicht allein aus der verbrauchten Glukose stammen kann, was aus dem molaren Quotienten Laktatbildung/Glukoseverbrauch ersichtlich ist (Tab. 5); denn ein Ansteigen über 2,0 weist auf zusätzliche Bildung von Laktat aus anderen Substraten hin.

Inkubationszeit	Molarer Quotient	<u>Laktat-Bildung</u> Glukose-Verbrauch
2 Tage	1,84	
4 Tage	2,07	
6 Tage	2,17	
8 Tage	4,68	

Tab. 5: Molarer Quotient Laktat-Bildung/Glukose-Verbrauch nach Inkubation von HPM-73 Kulturen mit einem Sauerstoff (93%)-CO₂ (7%) Gasgemisch über verschieden lange Inkubationszeiträume. (Kontrolle: 1,44)

3.5.2. Inkubation unter anaeroben Bedingungen

Entzug von Sauerstoff durch Züchtung von HP Melanomzellen in Gegenwart eines Stickstoff (93%) - CO₂ (7%) Gemisches verursachte eine Abnahme des zellulären Melaniningehaltes. Nach vier Tagen enthielten die Kulturen im Vergleich zu Kontrollen nur noch die Hälfte an Melanin, bezogen auf mg Protein. Auch nach 8 tägiger Inkubation unter diesen anaeroben Bedingungen war diese Verminderung zu finden. Der Proteingehalt lag nach 4 Tagen bei 80% und nach 8 Tagen bei 65% der Kontrollwerte.

3.5.3. Tyrosin

Erhöhung der Tyrosinkonzentration im Nährmedium auf 4×10^{-4} M verursachte bei einer Inkubationszeit von 3 Tagen eine leichte Erhöhung der E 400 in HPM-Zellen im Vergleich zu Zellen, die in normalem Nährmedium (10^{-4} M Tyrosin) gewachsen waren. Wenn der Melaniningehalt der Kontrollkulturen mit 100% gleichgesetzt wird, lag der der im erhöhten Tyrosinmedium gezüchteten Zellen bei 115%. Dieser geringe Effekt spricht nicht für einen signifikanten Substratmangel der Tyrosinase, gab aber trotzdem den Anlaß, als Kulturmedium immer solches mit erhöhtem Tyrosingehalt zu verwenden.

3.5.4. DOPA

Der Einfluß von DOPA wurde sowohl bei HPM-67 als auch bei HPM-73 Zellen untersucht. In beiden Fällen zeigt sich bei einer Konzentration von 10^{-5} M weder bezüglich des Melaniningehaltes, des Proteingehaltes noch des Thymidineinbaus Effekte. Bei DOPA 5×10^{-5} M jedoch war eine Steigerung des Melaniningehaltes auf $209 \pm 16\%$ zu finden, während Proteingehalt und TDR-Einbau nicht nennenswert beeinflusst wurden.

3.5.5. Kupfer

Zusatz von Kupferionen (10^{-6} M CuCl_2) zu HPM-73 Zellkulturen veränderten weder Melanin- noch Proteingehalt, noch DNS Synthese.

3.5.6. Kupfer + DOPA

Die Kombination der beiden Substanzen in Konzentrationen, bei denen jede einzeln angewendet, keinen Einfluß auf die Zellen hatte (10^{-6} M Kupfer, 10^{-5} M DOPA), brachte nach 3-tägiger Inkubation eine leichte Steigerung des Melaniningehaltes auf $142\% \pm 28$; Dabei blieben Proteingehalt und TDR-Einbau praktisch noch unverändert.

3.5.7. Einfluß der Serumkonzentration im Nährmedium auf HPM Zellkulturen

Der Serumgehalt der Nährmedien hat einen deutlichen Einfluß auf Wachstum, Melaniningehalt, Proteinsynthese und Thymidineinbau von HPM-Zellen in vitro.

Während bei 10% Serumgehalt die Verdopplungszeit der HPM-73 Zellen bei etwa 165h liegt, kommt es bei Zusatz von 0,5% Serum zum Stillstand des Wachstums und bei längeren Inkubationszeiten (über 7 Tage) zu einer allmählichen Abnahme des Kulturproteins. Dieser geringe Serumzusatz von 0,5% vermeidet jedoch den relativ starken Zellverlust, wie er in Kulturen ohne Serumgehalt auftritt (Abb. 18).

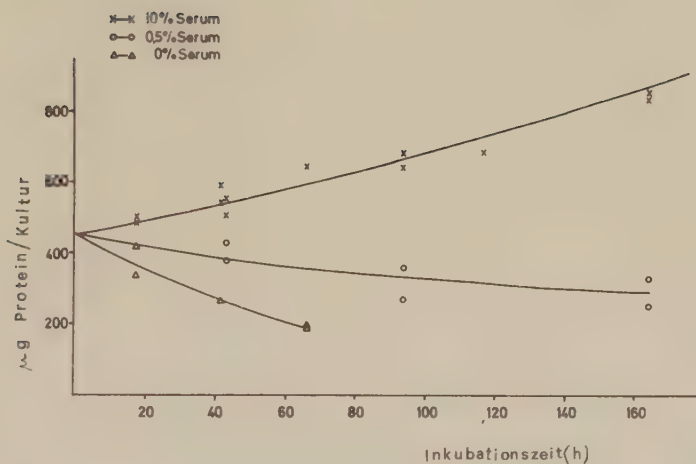


Abb. 18: Wachstumskurven von HPM-73 Zellkulturen in Medien mit 10%, 0,5% und 0% Gehalt an foetalem Kalbsserum

Daß in Gegenwart von 0% Serum bereits nach kurzer Inkubationszeit die Zellproliferation zum Erliegen kommt, wurde auch durch Messung der DNS Syntheserate nachgewiesen (Abb. 19). Aus diesen Einbaureisultaten ist ersichtlich, daß bereits nach 20 Stunden die DNS Syntheserate auf 15% der Kontrollwerte abgefallen ist.

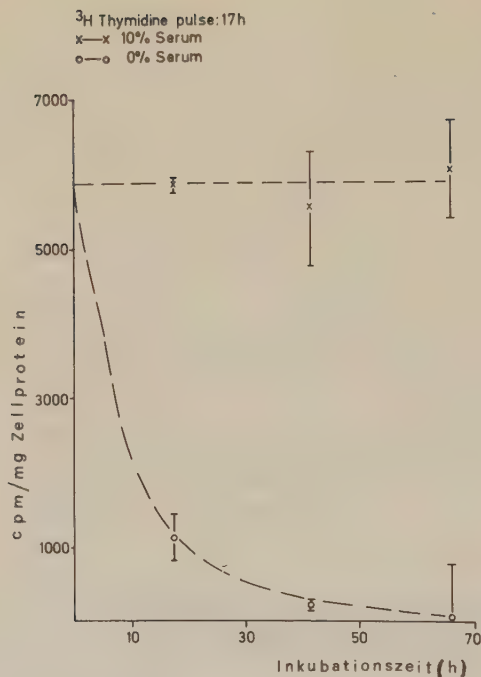


Abb. 19:
 Einbau von ^3H -Thymidin in die DNS von HPM-73 Zellkulturen während des Wachstums in Medien mit 10% oder 0% Serumgehalt

Eine Erhöhung des Serumgehaltes im Medium auf 20 oder 30% führte nach Inkubationszeiten von 7 Tagen zu einem um etwa 20% erhöhten Proteingehalt im Vergleich mit Kontrollkulturen (10% Serum).

Auf die Melaninbildung hat die Serumkonzentration einen deutlichen Einfluß. Nach eintägigem Serumentzug ist noch keine Veränderung im Melanin Gehalt festzustellen; aber schon nach 2 Tagen wird eine starke Erhöhung beobachtet, die auch bei längerem Wachstum auf etwa gleichem Niveau bleibt (Abb. 20).

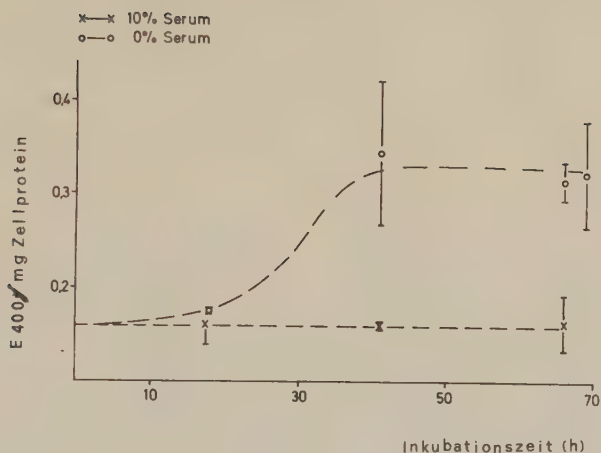


Abb. 20: Melaniningehalt von HPM-73 Zellkulturen nach Inkubation in Medien mit 0% und 10% Serumgehalt

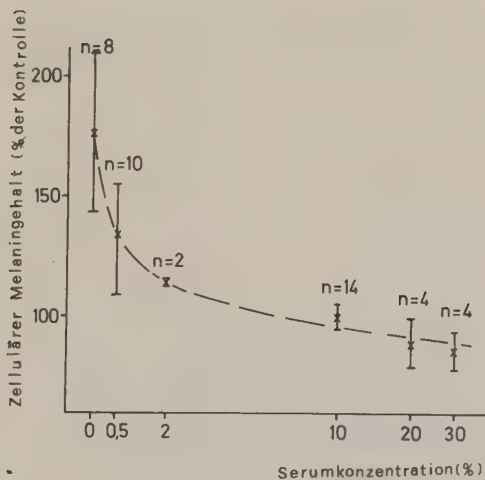


Abb. 21:
Relative Melanin-
bildung in HPM-
73 Zellkulturen
als eine Funk-
tion der Serum-
konzentration.
Inkubationszeit:
3 (4) Tage.
Melaniningehalt
der Kontrollen
(10% foetales
Kalbsserum)
E 400/mg Zell-
protein: 0,255 =
100%

Der Gebrauch von dialysiertem Serum ergab keinen Unterschied zu nicht dialysiertem in Bezug auf Melanin- und Proteingehalt und Thymidineinbau bei den so behandelten Zellen.

Verwendung von Kalbsserum anstelle von foetalem Kalbsserum brachte die gleichen Ergebnisse.

3.5.8. Einfluß von Theophyllin und Dibutyryl-cAMP

Durch Zusatz von Theophyllin ($5 \times 10^{-4} \text{M}$) oder Theophyllin zusammen mit dibutyryl-cAMP ($5 \times 10^{-4} \text{M}$) zum Medium wurde die Melaninsynthese in HPM-73 Zellen gesteigert. Noch ausgeprägter war die Wirkung bei zusätzlichem Serumentzug (Tab. 6). Dabei war die Erhöhung des Melaningehaltes größer als durch bloße Addition des Effektes von Medium, das 0% Serum allein bzw. von Medium mit 10% Serum und Theophyllin plus dibutyryl-cAMP enthielt, zu erzielen war.

% Serum	ohne Zusatz	Theophyllin ($5 \times 10^{-4} \text{M}$)	Theophyllin + dibutyryl-cAMP ($5 \times 10^{-4} \text{M}$)
10	100 $\pm$ 6 (n=24)	123 $\pm$ 13 (n=8)	146 $\pm$ 13 (n=8)
0,5	134 $\pm$ 25 (n=10)	174 $\pm$ 53 (n=4)	291 $\pm$ 36 (n=6)
0	176 $\pm$ 36 (n=8)	202 $\pm$ 41 (n=4)	364 $\pm$ 152 (n=6)

Tab. 6: Einfluß von Theophyllin oder der Kombination von Theophyllin mit Dibutyryl-cAMP auf die Melaninsynthese von HPM-73 Zellen nach Inkubation in Medien mit verschiedenen Serumgehalten; E 400/mg Zellprotein der Kontrollkulturen (10% Serum) 0,351 = 100%. Inkubationszeit: 3 Tage.

Der Proteingehalt von Kulturen, die mit Theophyllin und d.b.-cAMP inkubiert wurden, war im Vergleich zu Kontrollkulturen vermindert (Tab. 7). Allerdings fiel auf, daß d.b.-cAMP Zusatz (+ Theophyllin) bei Medien mit erniedrigtem oder

fehlendem Serumgehalt zu einem geringeren Proteinverlust führte, was möglicherweise auf eine verstärkte Haftung der Zellen an der Glasunterlage unter diesen Inkubationsbedingungen zurückzuführen ist.

% Serum	ohne Zusatz	Theophyllin ($5 \cdot 10^{-4}$ M)	Theophyllin + dibutyryl-cAMP ($5 \cdot 10^{-4}$ M)
10	100 $\pm$ 3 (n=12)	100 $\pm$ 6 (n=4)	74 $\pm$ 16 (n=10)
0,5	56 $\pm$ 13 (n=6)	50 $\pm$ 23 (n=2)	65 $\pm$ 13 (n=5)
0	34 $\pm$ 7 (n=6)	37 $\pm$ 17 (n=4)	55 $\pm$ 20 (n=4)

Tab. 7: Einfluß von Theophyllin oder der Kombination von Theophyllin mit Dibutyryl-cAMP auf den relativen Proteingehalt von HPM-73 Zellkulturen nach Inkubation in Medien mit verschiedenen Serumgehalten. Inkubationszeit: 3 Tage, Proteingehalt der Kontrolle (10% Serum) 0,529 mg = 100%

Die DNS-Syntheserate von Kulturen, die mit Theophyllin oder Theophyllin + d.b.-cAMP inkubiert wurden, war deutlich vermindert (Tab. 8).

% Serum	ohne Zusatz	Theophyllin ($5 \cdot 10^{-4}$ M)	Theophyllin + dibutyryl-cAMP ($5 \cdot 10^{-4}$ M)
10	100 $\pm$ 10 (n=8)	44 $\pm$ 14 (n=6)	30 $\pm$ 14 (n=2)
0,5	54 $\pm$ 34 (n=3)	18 $\pm$ 12 (n=2)	6 $\pm$ 3 (n=3)
0	8 $\pm$ 7 (n=4)	7 $\pm$ 1 (n=2)	1,5 $\pm$ 0,7 (n=2)

Tab. 8: Einfluß von Theophyllin oder der Kombination von Theophyllin und Dibutyryl-cAMP auf die Einbaurate von 3 H-TDR (in % der Kontrolle) in die DNS von HPM-73 Zellen nach Inkubation in Medien mit verschiedenen Serumgehalten. 3 H-TDR Einbau (6378 cpm/mg Zellprotein) der Kontrollkulturen = 100 % Inkubationszeit: 3 Tage, 3 H-TDR Einbau während der letzten 24 h der Inkubationszeit

Es stellte sich bei diesen Experimenten die Frage, ob das extrazelluläre Theophyllin + d.b.-cAMP oder serumfreies Medium einen Einfluß auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration hat.

Voraussetzung für eine signifikante Erfassung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (siehe 2.4.) war ein Proteingehalt der Kulturen von etwa 2 mg. Dabei wurde ein cAMP-Gehalt von etwa 0,55 p mol/mg Zellprotein festgestellt. Zusatz von Theophyllin + d.b.-cAMP oder serumfreiem Medium + Theophyllin + d.b.-cAMP führte zu einer nahezu 3-fachen Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (Tab. 9). Bedingt durch technische Probleme konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht der Einfluß von serumfreiem Medium allein auf den intrazellulären cAMP der Kulturen überprüft werden.

	Kontrolle (Serumgehalt: 10%)	Theoph.+ d.b.-cAMP (je $5 \cdot 10^{-4}$ M) (Serumgehalt: 10%)	Theoph.+ d.b.-cAMP (je $5 \cdot 10^{-4}$ M) (Serumgehalt 0%)
<u>p mol cAMP</u> mg Protein	0,55 $\pm$ 0,19 (n = 3)	1,45 $\pm$ 0,21 (n = 2)	1,60 $\pm$ 0,41 (n = 4)

Tab. 9: cAMP-Gehalt in HPM-73 Zellkulturen nach dreitägiger Inkubation in Normalmedium, in Normalmedium mit Theophyllin + d.b.-cAMP Zusatz und in serumfreiem Medium mit Theophyllin + d.b.-cAMP Zusatz

Der Vergleich zu unbehandelten Kulturen zeigte, daß Zusatz von Theophyllin + d.b.-cAMP in 10% serumhaltigem Medium zu einer Verdopplung der zellulären Tyrosinaseaktivität führte. In Gegenwart von serumfreiem Medium war die Tyrosinaseaktivität um 37% stimuliert. Durch Zusatz von Theophyllin + d.b.-cAMP zu serumfreiem Medium erhöhte sich die Tyrosinaseaktivität der Zellen bei dreitägiger Inkubation auf etwa 250% (Tab. 10).

	Kontrol- le	Theoph. + d.b.- cAMP (je $5 \times 10^{-4} M$)	0%Serum	Theoph. + d.b.- cAMP (je $5 \times 10^{-4} M$)
	(10% Serum)	(10% Se- rum)		(0% Se- rum)
Tyrosinase- aktivität (in % der Kontrolle)	100 ± 4 (n = 5)	207 ± 75 (n = 5)	137 ± 65 (n = 5)	252 ± 77 (n = 5)

Tab. 10: Tyrosinaseaktivität (Methodik siehe 2.3.2.) in % der Kontrolle (=100%) von HPM-73 Zellen nach Inkubation (3 Tage) in 10% serumhaltigem Medium mit Theophyllin + d.b.-cAMP, in serumfreiem Medium und in serumfreiem Medium mit Theophyllin + d.b.-cAMP

Die bisherigen Ergebnisse wurden mit HPM-73 Kulturen gewonnen. Von besonderem Interesse war auch der Einfluß von serumfreiem 0,5% und 10% serumhaltigem Nährmedium mit und ohne Theophyllin und d.b.-cAMP-Zusatz auf die relativ amelanotischen HPM-67 Zellen. Die Auswirkungen auf den Melaniningehalt sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

% Serum	Ohne Zusatz	Theophyllin + d.b.-cAMP (je $5 \times 10^{-4} M$)
10	100 ± 3 (n = 10)	104 ± 13 (n = 4)
0,5	226 ± 112 (n = 4)	251 ± 58 (n = 4)
0	259 ± 58 (n = 2)	178 ± 59 (n = 2)

Tab. 11: Einfluß von Theophyllin oder der Kombination von Theophyllin mit d.b.-cAMP auf den Melaniningehalt von HPM-67 Zellen nach dreitägiger Inkubation in Medien mit verschiedenen Serumgehalten. E 400/mg Protein der Kontrollen (10% Serum) 0,079 = 100%

Interessant ist, daß im Gegensatz zu HPM-73 Zellen zwar der Melaniningehalt in 0,5% serumhaltigem oder serumfreiem Medium sogar stärker zunahm (vergleiche Tabellen 6 und 11), jedoch Zusatz von Theophyllin+d.b.-cAMP keinen (zusätzlichen) stimulierenden Effekt auf den Melaniningehalt dieser Kulturen hatte. Damit stellt sich die Frage, ob diese HPM-67 Zellen möglicherweise "resistent" gegen exogenes cAMP sind. Messungen über den intrazellulären cAMP-Gehalt liegen bisher nicht vor.

Besonders auffällig war, daß die HPM-67 Kulturen im Gegensatz zu HPM-73 Kulturen sowohl in Gegenwart von 0,5% Serum und serumfreiem Medium als auch in Kombination mit Theophyllin und d.b.-cAMP in ihrem Wachstum weniger inhibiert waren. Das Wachstum wurde sowohl über Messung der Zunahme des Proteingehaltes der Kulturen als auch im Einbau von radioaktivem Leucin ins Protein als auch von radioaktivem Thymidin in die DNS verfolgt. (Vergleiche Tabelle 12). So war z.B. nach 3 tägiger Behandlung mit 0% Serum die DNS Syntheserate (^{14}C Thymidin Einbau) auf 50% reduziert, während sie bei HPM-73 Zellen auf 8% reduziert war. (Tab. 8).

% Serum	Ohne Zusatz		Theophyllin ($5 \times 10^{-4}\text{M}$)		Theophyllin + d.b.-cAMP (je $5 \times 10^{-4}\text{M}$)	
	^3H -Leu	^{14}C -TDR	^3H -Leu	^{14}C -TDR	^3H -Leu	^{14}C -TDR
10	100 (n=2)	100 (n=2)	90 (n=2)	75 (n=2)	80 (n=2)	50 (n=2)
0,5	90 (n=2)	80 (n=2)	90 (n=2)	70 (n=2)	60 (n=2)	15 (n=2)
0	70 (n=2)	50 (n=2)	55 (n=2)	25 (n=2)	40 (n=2)	3 (n=2)

Tab. 12: Einbau von ^3H -Leucin und ^{14}C Thymidin in HPM-67 Zellen nach dreitägiger Inkubation mit Theophyllin oder der Kombination von Theophyllin und d.b.-cAMP in Medien mit verschiedenen Serumgehalten. Ergebnisse in % der Kontrolle (10% Serum) cpm/mg Protein: ^3H -Leu: 32030 ^{14}C -TDR: 7950 = 100%
Inkubation mit den radioaktiven Substanzen während der letzten 24 Stunden

Die Wirkung von Theophyllin und d.b.-cAMP auf den Glukoseverbrauch und die Laktatbildung wurden überprüft. Dabei zeigte sich, daß das molare Verhältnis von Laktatbildung/Glukoseverbrauch unverändert war im Vergleich zu Kontrollkulturen, die im Normalmedium gewachsen waren.

3.5.9. Ganglioside und Choleratoxin

Es wurden 2 Experimente über den Einfluß von Gangliosid G_1 , $-G_3$, Choleratoxin und der Kombination von G_1 und Choleratoxin auf HPM-73 Zellen in Monolayer-Kultur durchgeführt.

Im ersten Experiment wurden die Zellen nach jeweils 30 minütiger Inkubation mit Gangliosid G_1 ($20 \mu\text{g/ml}$) oder mit Choleratoxin ($1 \mu\text{g/ml}$) oder nach Praeinkubation mit Gangliosid G_1 und anschließender Inkubation mit Choleratoxin jeweils über 30 Minuten im serumfreien Medium noch 2 Tage im Normalmedium (10% Serum) weitergezüchtet. Im 2. Experiment wurden Gangliosid G_1 ($20 \mu\text{g/ml}$), Gangliosid G_3 ($20 \mu\text{g/ml}$), Choleratoxin ($1 \mu\text{g/ml}$) und die Kombination von Choleratoxin ($1 \mu\text{g/ml}$) + Gangliosid G_1 ($20 \mu\text{g/ml}$) in serumfreiem Medium den Kulturen über 3 Tage zugesetzt. Dabei zeigte sich, daß die Ganglioside allein keinen Effekt auf die Melaninbildung in den HPM-Kulturen ausübten. Auch bei Zusatz von Choleratoxin allein ließ sich in keinem der Experimente ein eindeutiger Einfluß nachweisen. Die Kombination von Gangliosid G_1 und Choleratoxin erbrachte in beiden Experimenten eine Steigerung des Melanin gehaltes auf $198\% \pm 60$ im Vergleich zu Kontrollkulturen (= 100%).

3.5.10. MSH

Bei Zusatz von α - und β -MSH in Konzentrationen von 0,1, 10, 100, und 1000 ng/ml in 10% und 0,5% serumhaltigem Medium konnte während dreitägiger Inkubation keine Beeinflussung der Melaninsynthese gefunden werden.

Auch bei α - oder β -MSH (10 oder 1000 ng/ml) in serumfreiem Medium wurde nach 3 Tagen kein zusätzlicher Effekt auf den Melaningehalt in den Kulturen gefunden (Tabelle 13).

Serumgehalt des Nährme- diums	ohne Zusatz	α -MSH (0,1,10,100,1000 ng/ml)	β -MSH
10 %	100+ 14 (n=14)	94+ 15 (n=4)	100+ 39 (n=6)
0,5 %	134+ 25 (n=3)	147+ 7 (n=5)	134+ 12 (n=10)
0 %	180+ 30 (n=4)	193+ 42 (n=6)	185+ 10 (n=4)

Tab. 13: Prozentualer Melaningehalt in HPM-73 Kulturen nach Behandlung mit α -MSH und β -MSH in Medien mit verschiedenen Serumkonzentrationen. E 400/mg Protein der Kontrollkulturen (10% Serum): 0,392 = 100%

Auch nach Zusatz von α -MSH (10 oder 1000 ng) oder β -MSH (10 oder 1000 ng) zu Kulturen, die mit Theophyllin oder Theophyllin + d.b.-cAMP in serumfreiem Medium behandelt wurden, kam es zu keiner Erhöhung des Melaningehaltes (Tabelle 14). Es wurde sogar aus noch nicht geklärtem Grunde nach Zusatz von α -MSH oder β -MSH zu Kulturen, die mit Theophyllin + d.b.-cAMP behandelt wurden, eine Verringerung des Melaningehaltes gefunden.

Zusatz	Nährmedium (serumfreies BME)		
	-	+ Theophyllin ($5 \times 10^{-4} \text{ M}$)	+ Theophyllin + d.b.-cAMP (je $5 \times 10^{-4} \text{ M}$)
-	100 ± 9 (n=2)	121 ± 4 (n=2)	170 ± 7 (n=2)
α -MSH (10^{-1000} g)	100 ± 21 (n=6)	125 ± 25 (n=3)	131 ± 22 (n=4)
β -MSH (10^{-1000} g)	96 ± 5 (n=4)	120 ± 18 (n=3)	138 ± 15 (n=4)

Tab. 14: Prozentualer Melaniningehalt ($E_{400}/\text{mg Prot.}$ der Kontrolle (0%) $0,756 = 100\%$) von HPM-73 Zellen nach Behandlung mit α - und β -MSH in BME Medium, in BME + Theophyllin und BME + Theophyllin + d.b.-cAMP. Inkubationszeit: 3 Tage

Inkubation der HPM-Zellen in serumfreiem Medium, dem Albumin (0,2%) und MSH (200 ng/ml) zugesetzt wurde, hatte ebenfalls keinen größeren Effekt auf die Melaninsynthese als serumfreies Medium alleine.

3.5.11. Resochin

Dreitägige Einwirkung von Resochin (10^{-5} und 10^{-6} M) auf HPM-73 Zellkulturen konnte den Melaniningehalt stark erhöhen (Tabelle 15). Bei der auffallend hohen Melaninbildung in Gegenwart von Resochin ist jedoch zu beachten, daß die Zellen zum Zeitpunkt des Experimentes wahrscheinlich besonders leicht zu stimulieren waren; denn der Zusatz von Theophyllin + cAMP zu 10% serumhaltigen Medium, der normalerweise den Melaniningehalt auf $146\% \pm 13$ gegenüber 100% der Kontrolle erhöht, brachte eine Steigerung auf $900\% \pm 185$. Dennoch ist die Wirkung von Resochin beachtlich, wobei dieses auch noch einen zusätzlich stimulierenden Effekt in Gegenwart von Theophyllin und d.b.-cAMP zeigte.

Nährmedium	Resochin		
	-	($10^{-6}M$)	($10^{-5}M$)
10% Serum	100 $\pm$ 3	681 $\pm$ 310	1243 $\pm$ 169
10% Serum + Theoph.+ d.b.-cAMP (je $5 \times 10^{-4}M$)	900 $\pm$ 185	1177 $\pm$ 235	1250 $\pm$ 478

Tab. 15: Einfluß von Resochin auf die Melaninsynthese von HPM-73 Kulturen. E 400/mg Protein der Kontrollen (10% Serum): 0,113 = 100 %

Die gleichen Resochinkonzentrationen beeinflussten die Proteinsynthese - gemessen am 3H -Leucin Einbau - nicht, während die DNS Synthese - gemessen am ^{14}C -Thymidin Einbau - in Gegenwart von $10^{-5}M$ Resochin zu 24% gehemmt war (Tabelle 16).

	3H -Leucin cpm/mg Protein	Hem- mung (%)	^{14}C -Thymidin cmp/mg Protein	Hem- mung (%)
Kontrolle	22961 $\pm$ 2072	-	11320 $\pm$ 2136	-
Resochin ($10^{-6}M$)	24505 $\pm$ 7423	-	10503 $\pm$ 3693	7
Resochin ($10^{-5}M$)	23612 $\pm$ 2054	-	8586 $\pm$ 529	24
Th + cAMP	14832 $\pm$ 626	35	2093 $\pm$ 434	81
Th + cAMP + Resochin ($10^{-6}M$)	16679 $\pm$ 480	27	2834 $\pm$ 412	74
Th + cAMP + Resochin ($10^{-5}M$)	14591 $\pm$ 1087	36	1496 $\pm$ 16	87

Tab. 16: Einfluß von Resochin, Theophyllin + d.b.-cAMP (allein oder in Kombination mit Resochin) auf den Einbau von 3H -Leucin und ^{14}C -Thymidin in die säureunlösliche Fraktion von HPM-73 Zellen in Kultur

3.6. Einfluß von Melanosomen, Melanin und Tyrosinase auf HPM Zellkulturen

3.6.1. Fraktionierung von HPM Gewebe: Isolierung von Melanosomen und Bestimmung der Tyrosinaseaktivität

In Anlehnung an die von SEIJI und MITARB., (1963) angewandte Methodik zur Isolierung von Melanosomen wurde HPM-Gewebe, das aus dem subkutanen Tumor einer Maus gewonnen wurde, fraktioniert und hinsichtlich der Verteilung der Tyrosinaseaktivität in den einzelnen Fraktionen untersucht.

Um einen Überblick über die Fähigkeit der einzelnen Fraktionen zur Melaninsynthese zu erhalten, wurden sie mit radioaktivem Tyrosin inkubiert und der Einbau ins Melanin bestimmt. Dieser Einbau wurde als Maß für die Tyrosinaseaktivität bestimmt (siehe 2.3.2.a.). Nach 2-stündiger Inkubation wurden von den einzelnen Fraktionen folgende Mengen Tyrosin ins Melanin eingebaut:

Gewebefraktion	^{14}C -Tyrosin-Einbau (n mol/Fraktion)	Prozentualer Anteil
Gesamthomogenat	716	100
Kernfraktion	34	4
große-Granula-Fraktion	122	16
kleine-Granula-Fraktion	513	68
lösliche Anteile	94	12

Tab. 17: Verteilung des Tyrosin-Einbaus in die nach der Methode von SEIJI u. MITARB. (1963) gewonnenen Fraktionen von Melanomgewebe. Nach Homogenisieren (Potter) des Gewebes in Saccharose (1+8) wurde dieses Gesamthomogenat 10 Minuten bei 700 g zentrifugiert (Sediment=Kernfraktion), der Überstand bei 11000 g (Sediment= große-Granula-Fraktion= Mitochondrien + große, melaninreiche Melanosomen) zentrifugiert. Der gewonnene Überstand ergab nach 1 h Zentrifugation bei 100 000 g (Sediment= kleine-Granula-Fraktion = weniger stark melanisierte Melanosomen, Endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen) die Fraktion der löslichen Anteile. Der Tyrosineinbau erfolgte unter der in 2.3.2.a angegebenen Methodik.

Für die Isolierung reiner Melanosomen wurde die große-Granula-Fraktion verwendet, die durch Ultrazentrifugation im Saccharose Gradienten weiter aufgearbeitet wurde. Der Gradient wurde in 5 Fraktionen unterteilt, wobei von oben nach unten 1,25; 0,75; 1,25; 1,25 und 0,5 ml abgenommen wurden (= Fraktionen 1-5). Dabei verteilte sich die Tyrosinaseaktivität folgendermaßen:

Fraktion	^{14}C -Tyrosin-Einbau (n mol Tyrosin)	Prozentualer Anteil
1	5	1,4
2	6	1,4
3	36	9,7
4	91	24,5
5	234	63

Tab. 18: Verteilung des Einbaus von radioaktivem Tyrosin in 5 Fraktionen, die durch Dichtegradienten-Zentrifugation (1 h bei 100 000 g) (Gradient: 1,5 - 2,6 M Saccharose) aus der großen Granula-Fraktion (siehe Tab. 19) gewonnen wurden

Von besonderem Interesse ist bei dem Ergebnis des Tyrosineinbaus, daß nach der hypertonen Saccharose-Behandlung der Gesamteinbau der großen-Granula-Fraktion etwa 3 mal so hoch ist, wie in der nicht fraktionierten (vergleiche Tabellen 17 und 18). Diese Erhöhung könnte auf eine Aktivierung durch die hypertone Behandlung zurückzuführen sein.

Aus der Berechnung der spezifischen Aktivität (Tyrosin-Einbau ins Melanin/ mg Protein) ergibt sich ein Anreicherungsfaktor der Tyrosinaseaktivität in Fraktion 5 von 5,3 im Vergleich zum Ausgangshomogenat.

Die Melanosomenfraktion 5 des Gradienten wurde auch elektronenmikroskopisch untersucht. Sie ergab das Bild einer reinen, nicht mit Mitochondrien verunreinigten Melanosomenpräparation, wobei Melanosomen von unterschiedlicher Größe zu erkennen sind.

In den weniger stark melanisierten Melanosomen sind die für Melanosomen charakteristischen lamellären Strukturen mit unterschiedlichem Melaniningehalt zu erkennen.

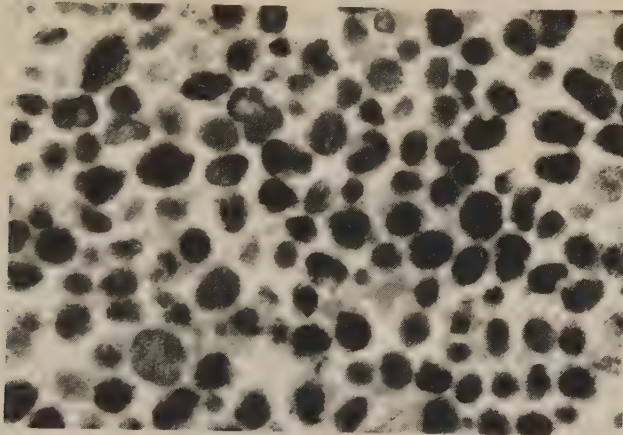


Abb. 22: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Melanosomenpräparation (Fraktion 5 des Saccharose-Gradienten nach der von SEIJI u. MITARB. (1963) beschriebenen Methodik)

3.6.2. Untersuchung von in vivo mit ^{14}C -Tyrosin markierten Melanosomen

Nach in vivo (i.p.) Applizierung von ^{14}C -Tyrosin (siehe 2.6.1.) sollte versucht werden, Melanosomen sowohl in ihrem Melanin- als auch in ihrem Proteinanteil zu markieren. Diese markierten Melanosomen sollten als Tracer zum Studium von Phagozytoseprozessen unter Kulturbedingungen verwendet werden.

Isolierung von markierten Melanosomen (Fraktion 5, siehe 2.6.1.) aus diesem in vivo markierten Melanomgewebe ergab die in Tabelle 19 zusammengefaßten Ergebnisse. Dabei wurde die E 400 und die

Radioaktivität von 1 ml Melanosomensuspension (Herstellung s. 2.6.1) bestimmt, wobei einmal die Melanosomen als Ganze untersucht wurden und einmal die Melanosomen, die nach 2.6.2 in Protein und Melaninanteil aufgetrennt waren.

	E 400/ml	cpm/ml	$\frac{\text{cmp Mel.}}{\text{cpm Prot.}}$
Melanosomen	2,860	2400	
Melaninanteil	2,840	1640	2,6
Proteinanteil	0,000	640	

Tab. 19: E 400 und Einbau von radioaktivem Tyrosin in Melanosomen, die nach 2.6.1. in vivo markiert wurden.

3.6.3. Melanosomenmarkierung in vitro

Trotz Applikation von recht hohen Mengen an radioaktivem Tyrosin unter in vivo Bedingungen war letztlich nur ein geringer Anteil (0,15%) in den Melanosomen wiederzufinden. Um Melanosomen mit einer höheren spezifischen Radioaktivität zu erhalten, wurden deshalb durch in vitro Markierung mit ^{14}C -Tyrosin Melanosomen präpariert, die zwar das Tyrosin nur im Melaninanteil inkorporiert hatten, jedoch eine viel höhere spezifische Radioaktivität aufwiesen. Bei dieser Methode wurde nur die große-Granula-Fraktion markiert (siehe 2.6.3).

Nicht inkorporiertes Tyrosin wurde durch zweimaliges Abzentrifugieren der Melanosomen im Phosphatpuffer entfernt. Durch Bestimmung der Radioaktivität im säurelöslichen Anteil und Isolierung des Melanins wurde gezeigt, daß in diesen gewaschenen Melanosomen die gesamte Radioaktivität ins Melanin eingebaut war.

Der Einbau von radioaktivem Tyrosin über eine Inkubationszeit von 18 h in die große-Granula-Fraktion verlief in der in Tabelle 20 angegebenen Weise.

	Inkubationszeit (h)				
	0,5	1	2	5	18
cpm $\times 10^{-6}$	0,27	0,33	0,55	1,39	1,46

Tab. 20: Einbau von radioaktivem Tyrosin in die große-Granula-Fraktion von 1 g Frischgewebe des HARDING-PASSEY-Melanoms über eine Inkubationszeit von 18 h (Methodik siehe 2.6.1)

Die Bestimmung der E 400 und der Radioaktivität in 1 ml Melanosomensuspension (Herstellung siehe 2.6.1) ergab eine E 400 von 9,15/ml und 268 000 cpm/ml.

3.6.4. Herstellung von ^{14}C markiertem Melanin

Das nach 2.6.6. hergestellte Melanin ergab pro 1 ml Melaninsuspension eine E 400 von 12.7 und enthielt 422 300 cpm.

3.6.5. Behandlung der Zellkulturen mit Melanosomen

Um herauszufinden, ob HPM Zellen fähig sind, dem Nährmedium zugesetzte (exogene) Melanosomen aufzunehmen (Phagozytose von Melanosomen), wurden HPM-Zellkulturen sowohl in der stationären als auch in der exponentiellen Wachstumsphase mit Melanosomen inkubiert, die vorher mit ^{14}C - oder ^3H -Tyrosin in vivo bzw. in vitro markiert und isoliert worden waren.

3.6.5.a. Behandlung mit in vitro markierten Melanosomen

Die HPM-Kulturen wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen mit exogenen Melanosomen inkubiert, wobei das Medium alle 2 Tage unter Zusatz frischer Melanosomen gewechselt (0,1 ml Melanosomensuspension/10 ml

Nährmedium) und die Kulturen nach 1h, 5h, 1,3,4,5, 6 und 8 Tagen aufgearbeitet und der Melaniningehalt der Kulturen bestimmt wurde. Aus Abb. 23 geht hervor, daß eine relativ schnelle Aufnahme der Radioaktivität (Melanosomen) innerhalb der ersten 5 h erfolgt, die danach in eine weitere verlangsamte Aufnahme übergeht. Andererseits kommt es zu einem Anstieg des zellulären Melaniningehaltes nach einer Verzögerungsphase von etwa 1 h. Nach einem Zeitraum von ca. 1 - 2 Tagen geht der Anstieg des Melaniningehaltes in seinem Verlauf etwa parallel zur Melanosomenaufnahme.

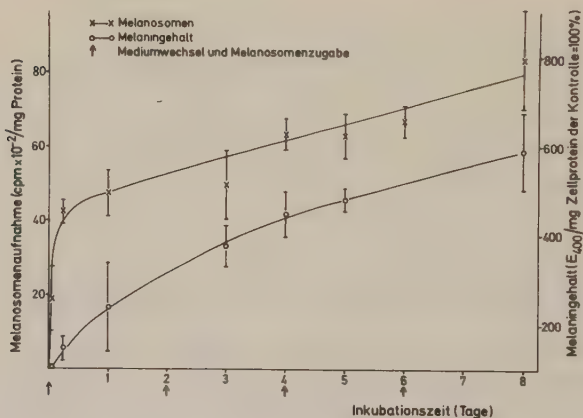


Abb. 23: Aufnahme von radioaktiv markierten Melanosomen und Stimulierung der zellulären Melaninsynthese in HPM-73 Zellen nach Zusatz von Melanosomen. (E₄₀₀, die durch die aufgenommenen Melanosomen verursacht wurde, ist abgezogen.)

Aufgrund der mikroskopischen Beobachtungen (Zunahme stark melaninhaltiger, "runder" Zellen) und der bei der Aufarbeitung angewandten Waschprozedur (mehrmaliges Spülen der Zellen mit Earle's Salzlösung) ist es unwahrscheinlich, daß diese Ergebnisse durch

Absorption von Melanosomen an die Zellen erklärt werden können.

Ferner zeigt ein Vergleich dieses Anstieges mit dem Melaniningehalt der zugesetzten Melanosomen, daß das in den Zellen entstandene Melanin auf zusätzliche Melaninsynthese zurückgeführt werden muß. So enthielten Kontrollkulturen (nicht mit Melanosomen inkubierte), die zum gleichen Zeitpunkt aufgearbeitet wurden, wie mit Melanosomen inkubierte, in einem Experiment z.B. 100% Melanin, während die Melanosomen-behandelten 440% enthielten. Nach Abzug des Melanins, daß in den aufgenommenen Melanosomen vorhanden war, ergab sich noch immer ein erhöhter Melaniningehalt von 375 %.

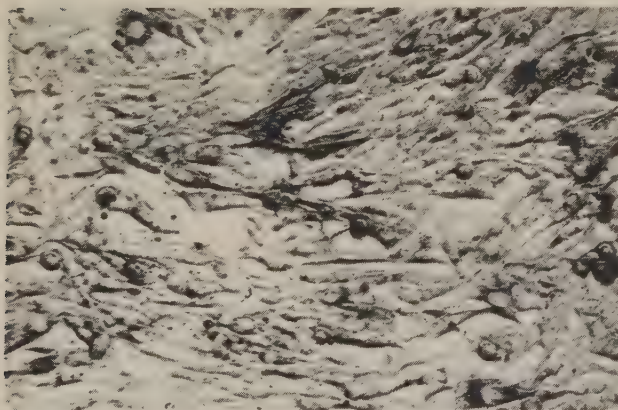


Abb. 24: HPM-73 Zellen in Kultur nach 6-tägiger Inkubation in Nährmedium ohne Melanosomen (Vergrößerung 675 fach)

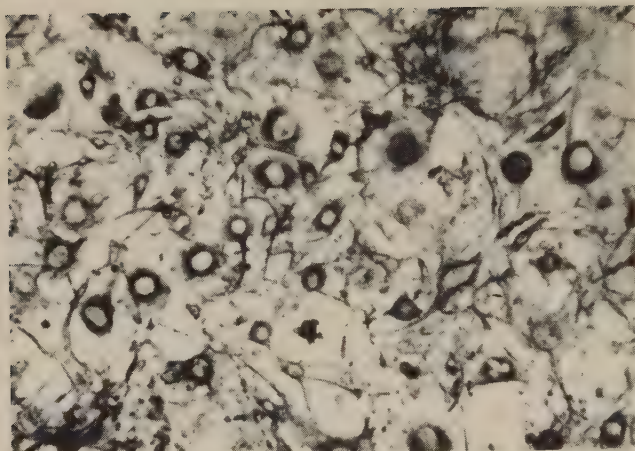


Abb. 25: HPM-73 Zellen in Kultur nach sechstägiger Inkubation im Nährmedium + Melanosomensuspension. Besonders viel Melanin ist in den "Rundzellen" zu finden, die bedeutend größer sind als die übrigen, und deren Anteil mit Länge der Inkubationszeit mit Melanosomen zunimmt (Vergrößerung: 675 fach)

Dafür, daß die Zellen nach Inkubation mit radioaktiv markierten Melanosomen diese Partikel wirklich aufgenommen und nicht nur absorbiert haben, spricht auch ein Experiment, in dem mehrere Kulturen 2 Tage mit markierten Melanosomen praeinkubiert und dann in melanosomenfreiem Medium weiterinkubiert worden sind (alle 2 Tage Mediumwechsel). Dabei zeigte sich, daß die Radioaktivität (Melanosomen) auch nach 8 Tagen noch vollständig in den mit Melanosomen präinkubierten Kulturen vorhanden war. Der Melanin-gehalt stieg nach 2-tägiger Inkubation mit Melanosomen auf 223% und nahm danach nicht weiter zu.

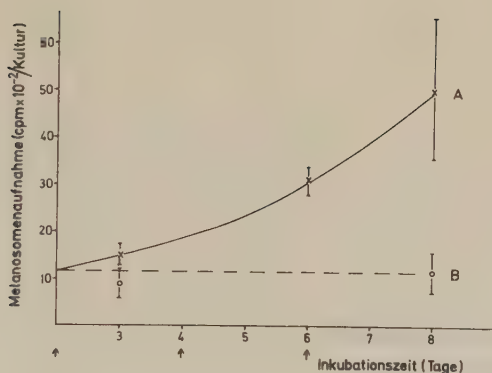


Abb. 26: Zelluläre Radioaktivität in HPM-73 Zellen nach Inkubation mit radioaktiv markierten Melanosomen.

- A.) fortlaufender Mediumwechsel + Melanosomensuspension nach 2-tägiger Präinkubation mit Melanosomen,
 B.) fortlaufender Mediumwechsel - Melanosomensuspension nach 2-tägiger Präinkubation mit Melanosomen

Auch bei Inkubation der Zellen mit Melanosomen im serumfreien Medium war die Aufnahme von Melanosomen ähnlich wie in Gegenwart von 10% serumhaltigem Medium (Tabelle 21).

Inkubationszeit	Melanosomen	
	10% Serum cpm/mg Protein	0% Serum Med. cpm/mg Protein
1 Tag	6117 ± 767	5779 ± 1782
3 Tage	6409 ± 18	6479 ± 805

Tab. 21: Aufnahme von radioaktiv markierten Melanosomen durch HPM-73 Kulturen in Nährmedien mit 10% oder 0% Serumgehalt

Der Melaningehalt der mit Melanosomen und serumfrei behandelten Kulturen war nach 3 Tagen bei 787% (Kontrolle: 10% Serum - Melanosomen = 100%) und ließ sich auch durch zusätzliche Gabe von Theophyllin und d.b. cAMP (je $5 \cdot 10^{-4}$ M) nicht mehr erhöhen (Tabelle 22).

Zusatz	Zellulärer Melaningehalt (in%) (E400/mg Zellprotein der Kontrolle = 0,174)	
+ Serum (Kontrolle)	100	
- Serum	200	
- Serum + Theoph. + d.b.cAMP	535	
- Serum + Melanosomen	901	(787)
- Serum + Melanosomen + Theoph. + c.b.cAMP	874	(770)

Tab. 22: Prozentuale Erhöhung des Melaningehaltes in HPM-73 Kulturen nach Inkubation (72h) in serumfreiem Medium mit und ohne Zusatz von Melanosomen und Theophyllin + d.b.-cAMP. Zum Zeitpunkt 0 und nach 48 h wurden jeweils 0,1 ml Melanosomensuspension (E 400 = 0,915 und 26 800 cpm) zugesetzt. Der Anteil des auf die inkorporierten Melanosomen entfallenden Melanins wurde durch Bestimmung der eingebauten Radioaktivität ermittelt. (Zahlen in Klammern: Melaningehalt nach Abzug des Melanins der inkorporierten Melanosomen.)

3.6.5.b. Behandlung mit in vivo markierten Melanosomen

Da in den unter 3.6.5.a. beschriebenen Experimenten die Melanosomen nur im Melaninanteil markiert waren, kann auf Grund der von den Zellen inkorporierten Radioaktivität nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, daß die Gesamtmelanosomen von den Zellen aufgenommen wurden. Eine solche Annahme könnte dadurch wahrscheinlicher gemacht werden, wenn der Nachweis erbracht würde, daß sowohl der Protein- als

auch der Melaninanteil von den Kulturzellen aufgenommen wurde. Ein solcher Nachweis könnte mit elektronenmikroskopischer Methodik durchgeführt werden, der sich aber auf Grund der in den Melanomzellen schon vorhandenen Melanosomen sehr schwierig gestalten dürfte. Eine andere Möglichkeit wäre, mit biochemischer Methodik die Melanosomen sowohl im Protein- als auch im Melaninanteil zu markieren und dann nach Aufnahme in die Zellen zu untersuchen, ob das Verhältnis der Radioaktivität im Melanin- und Proteinanteil gleich geblieben ist. Das spräche dafür, daß die Melanosomen als Gesamtpartikel aufgenommen wurden.

Ein solches Experiment wurde mit den in vivo markierten und isolierten Melanosomen (siehe 2.6.1) durchgeführt. Dabei wurde die Melanosomensuspension den Kulturen über 4 und 8 Tage zugegeben.

Nach Aufarbeiten der Zellen (siehe 2.7.2) und Lösen des Zellrückstandes in 1 N NaOH wurde diese Lösung auf eine Konzentration von 6 N HCl gebracht und 19 h bei 105° unter Stickstoffatmosphäre hydrolysiert. Danach wurde das Melanin abzentrifugiert und nach 3 maligem Waschen mit 0,01 N HCl getrocknet und in 1 N NaOH gelöst. Der Überstand, das Proteinhydrolysat, wurde 4 h lyophilisiert und anschließend auch in 1 N NaOH gelöst. Nach Bestimmung der E 400/ml und der Radioaktivität (cpm/ml) ergab sich für cpm im Melanin zu cpm im Protein ein Quotient von 4,1. Dieses Verhältnis entspricht nicht genau dem der zugesetzten Melanosomen, sondern es findet sich nach der Inkorporation relativ mehr Radioaktivität im Melanin- als im Proteinanteil der Zellen. Da hier nur die Aufnahme nach längeren Inkubationszeiten (mehrere Tage) geprüft wurde, muß in weiteren Experimenten mit kurzen Inkubationszeiten (1h-1Tag) herausgefunden werden, ob es unter den Langzeitbedingungen möglicherweise zu intrazellulären Veränderungen der inkor-

porierten Melanosomen kommt (Degradation des Proteinanteils?).

3.6.6. Einfluß von Dinitrophenol (DNP) und Actidion auf die zelluläre Melanosomenaufnahme und Melaninbildung

Um einen Anhalt zu bekommen, wie weit die Melanosomenaufnahme und die Melaninbildung von der zellulären ATP- bzw. der Proteinsynthese abhängig sind, wurden die Kulturen in Gegenwart eines Entkopplers der oxydativen Phosphorylierung (DNP) und eines Hemmstoffes der Proteinbiosynthese (Actidion) über einen Zeitraum von 1 und 3 Tagen inkubiert.

Aus Tabelle 23 geht hervor, daß die Melanosomenaufnahme in Gegenwart von 10^{-4} M DNP nach 1 Tag um etwa 20% gegenüber den nicht behandelten Kontrollen vermindert ist, während die weitere Aufnahme nach 3 Tagen völlig inhibiert ist.

Zusatz	Aufnahme von Melanosomen (cpm/mg Protein)	
	1 Tag	3 Tage
Melanosomen (Kontrolle)	6117 ± 767 (n=2)	6409 ± 19 (n=2)
Melanosomen + DNP (10^{-4} M)	4917 ± 17 (n=2)	4365 ± 407 (n=2)

Tab. 23: Einfluß von Dinitrophenol (10^{-4} M) auf die Aufnahme von radioaktiv markierten Melanosomen in HPM-73 Zellen. Zum Zeitpunkt 0 und nach 48 h wurde jeweils 0,1 ml Melanosomensuspension (= 26 800 cpm) zugesetzt

Auch der Melaningehalt der mit Melanosomen und DNP inkubierten Kulturen liegt unter dem der nur mit Melanosomen behandelten (siehe Tabelle 24).

Zusatz	Zellulärer Melaniningehalt (in %)	
	1 Tag	3 Tage
Melanosomen	239 $\pm$ 131	324 $\pm$ 63
Melanosomen + DNP (5×10^{-4} M)	201 $\pm$ 10	167 $\pm$ 23

Tab. 24: Prozentualer Melaniningehalt von HPM-73 Kulturen nach Inkubation mit Melanosomen und mit oder ohne Dinitrophenol. (E 400/mg Protein der Kontrollen (10% serumhaltiges Nährmedium ohne Melanosomenzusatz) = 0,063 = 100%) E 400, die durch die aufgenommenen Melanosomen verursacht wurde, ist abgezogen

Zusatz von Actidion ($0,2 \mu\text{g/ml}$) verursachte schon nach eintägiger Inkubation toxische Effekte, die zu einem Zellverlust von etwa 50% gegenüber Kontrollkulturen führten. Trotzdem kam es in den Kulturen zu einem 50%igen Anstieg der Radioaktivität/mg Zellprotein (siehe Tabelle 26).

Die nach der Inkubation mit Actidion verbleibenden Zellen wiesen einen erhöhten Melaniningehalt auf (Tabelle 26). Dieser relative Anstieg des Melaniningehaltes könnte einerseits dadurch erklärt werden, daß, wie auch unsere mikroskopischen Beobachtungen zeigten, während der Actidionbehandlung Zellen mit wenig Melanin "bevorzugt" abgetötet wurden und sich dann von der Glaswand abgelöst haben. Dies könnte dadurch bedingt sein, daß die stärker melanisierten Zellen ein eingeschränktes Wachstum ("stationär") aufweisen und möglicherweise in ihrem Stoffwechsel durch Actidion nicht so stark beeinflußt werden, wie exponentiell wachsende. Andererseits könnte der relative Anstieg des Melaniningehaltes bei inhibierter Proteinsynthese darauf zurückzuführen sein, daß die Melaninsynthese auch bei inhibierter Proteinsynthese weiterläuft, bzw. weniger stark inhibiert ist. Für diese ziemlich wahrscheinliche Erklärung sprechen Befunde, die

durch vergleichende Bestimmungen des Einbaus von Leucin und Tyrosin in Gegenwart von Actidion erhoben wurden (siehe Tabelle 25).

Actidion (0,2 μ g/ml)	^3H Leucin	cpm/mg Protein			
		Einbau in %	^{14}C Tyrosin	Einbau in %	
-	46 084 $^{\pm}$ 3135	100	7725 $^{\pm}$ 951	100	
+	8 066 $^{\pm}$ 50	18	3425 $^{\pm}$ 286	44	

Tab. 25: Einbau von Leucin und Tyrosin in HPM-73 Zellen bei Behandlung mit oder ohne Actidion bei eintägiger Inkubation

Bedingt durch den relativ hohen Zellverlust (ca. 50%) müssen die Befunde bezüglich der Interferenz von inhibierter Proteinsynthese (durch Actidion) und Melanosomenaufnahme mit einer gewissen Einschränkung betrachtet werden; jedoch ist auffällig, daß die nach Actidion-Behandlung an der Glashaftfläche verbleibenden Zellen einen relativ höheren Gehalt an aufgenommenen Melanosomen (Radioaktivität) aufwiesen (Tabelle 26).

Actidion (0,2 μ g/ml)	mg Protein/ Kultur	cpm/mg Protein	E 400/mg Protein
-	1,21 $^{\pm}$ 0,37	3463 $^{\pm}$ 226	0,94 $^{\pm}$ 0,11 (0,78 $^{\pm}$ 0,10)
+	0,67 $^{\pm}$ 0,13	5242 $^{\pm}$ 221	1,28 $^{\pm}$ 0,04 (1,06 $^{\pm}$ 0,06)

Tab. 26: Proteingehalt, Melanosomenaufnahme (cpm/mg Protein) und Melaningegehalt (E400/mg Protein) von HPM-73 Kulturen nach 1 Tag Inkubation mit radioaktiv markierten Melanosomen und mit oder ohne Actidion. Es wurde 0,1 ml Melanosomensuspension zugegeben (E400 = 0,915 und 26800 cpm) Zahlen in Klammern: Melaningegehalt nach Abzug des Melanins der inkorporierten Melanosomen

3.6.7. Behandlung der Zellen mit radioaktiv markiertem Melanin

Auch radioaktiv markiertes Melanin (siehe 3.6.4.) wurde von den HPM-73 Zellen während Inkubationszeiten von 1 h und 3 und 5 Tagen aufgenommen. In den in Tabelle 27 zusammengefaßten Ergebnissen zeigt sich, daß nach 1 h erst ca. 8% des nach 3 Tagen Inkubationszeit inkorporierten Melanins aufgenommen war, und daß nach weiterer Inkubation (bis zu 5 Tagen) keine weitere Steigerung der zelleigenen Aufnahme zu erzielen war.

Die melaninbehandelten Kulturen wiesen bei der Aufarbeitung im Vergleich zu Kontrollkulturen (-Melanin) einen wesentlich höheren Melaningehalt auf. Berechnet man jedoch auf Grund der eingebauten Radioaktivität die Menge des von den Zellen aufgenommenen Melanins, dann zeigt sich, daß dieses aufgenommene Melanin nicht zu einer signifikanten Veränderung der zelleigenen Melaninsynthese geführt hat (Tabelle 27).

Zusatz	cpm/mg Protein			E 400/mg Protein		
	1h	3 Tage	5 Tage	1h	3 Tage	5 Tage
- Melanin	-	-	-	0,06 ±0,03	0,09 ±0,04	0,12 ±0,08
+ Melanin	3987 ± 327	32858 ± 2129	30147 ± 3238	0,15 ±0,11 (0,05)	1,12 ±0,30 (0,10)	0,94 ±0,19 (0,12)

Tab. 27: Aufnahme von radioaktivem Melanin (cpm/mg Protein) und Melaningehalt (E400/mg Protein) von HPM-73 Kulturen. Zum Zeitpunkt 0,2 und 4 Tage wurde jeweils 0,1 ml Melaninsuspension (E400 = 1,27 und 42 230 cpm) den Kulturen zugesetzt. Zahlen in Klammern: Zelleigener Melaningehalt, d.h. E400/mg Protein von melaninbehandelten Zellen - E400 des aufgenommenen Melanins/mg Zellprotein

3.6.8. Behandlung der Zellen mit "Überstand" (lösliche Tyrosinase + Melanosomen)

Der bei der Melanosomenpräparation gewonnene Überstand nach der Zentrifugation bei 11 000 g (siehe 2.6.1) wurde den HPM-73 Zellen über 1, 3 und 5 Tage zugesetzt. Dabei kam es besonders nach längeren Inkubationszeiten zu einem erheblich höheren Melaningegehalt der behandelten Zellen (Abb. 27). Da dieser Überstand neben löslicher Tyrosinase vor allem noch weniger melanisierte Melanosomen, Endoplasmatisches Retikulum und möglicherweise an Ribosomen gebundene Tyrosinase (SEIJI, 1963) enthielt, wurde dieser in einem weiteren Experiment bei 100 000 g 1 Stunde lang zentrifugiert und der gewonnene Überstand dann den Zellen zugesetzt, um zu prüfen, ob die dann noch vorhandene lösliche Tyrosinase den Melaningegehalt der behandelten Zellen auch noch beeinflusst.

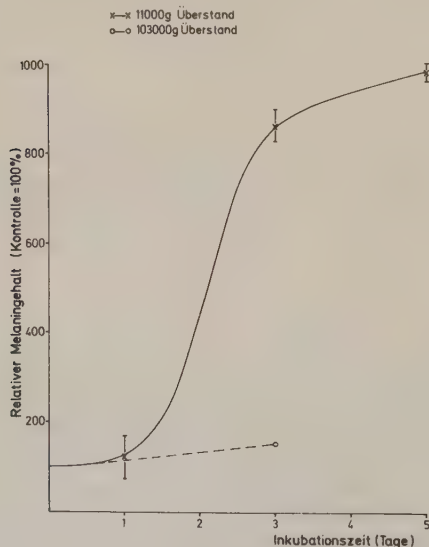


Abb. 27: Stimulierung der zellulären Melaninsynthese in HPM-73 Zellen nach Zusatz von 11 000 g und 103 000 g Überstand (E 400/mg Protein von Kontrollkulturen: 0,104 = 100%)

Bezogen auf die Stimulationsfähigkeit des 11 000 g Überstandes ist die stimulierende Aktivität des 100 000 g Überstandes sehr gering (Abb. 27). Sie beträgt nach 3 tägiger Inkubation etwa 6 % des 11 000 g Überstandes. Allerdings muß hierbei berücksichtigt werden, daß der Anteil von löslicher Tyrosinase (100 000 g) an der Gesamttyrosinaseaktivität des Zellhomogenates nur etwa 10% beträgt (siehe Tabelle 17).

Andererseits ist jedoch auffällig, daß solche Partikel, die Tyrosinase gebunden enthalten (Melanosomen, 11 000 g Überstand) besonders stark stimulierend auf die Melaninsynthese wirken. Während die Stimulierung durch Melanosomen nach einer Latenzzeit von 1 h einsetzte (Abb. 23) fällt bei Zusatz von 11 000 g Überstand auf, daß die Stimulierung deutlich verlangsamt begann mit einer Verzögerungsphase von etwa 1 Tag.

Das könnte darauf zurückzuführen sein, daß es sich im letzteren Fall um weniger melanisierte Melanosomen mit einer inaktiven oder weniger aktiven Tyrosinase handelt, die nach Zusatz zu den Kulturen möglicherweise erst aktiviert werden muß. Da jedoch die Messung der Tyrosinaseaktivität keinen Anhalt für eine solche Hypothese gibt (siehe Tab.17), muß daran gedacht werden, daß diese weniger melanisierten, aus in vivo Gewebe isolierten Melanosomen noch nicht in einem für die Melaninsynthese oder Melaninablagung befähigten "strukturellen Reifungszustand" sind, so daß möglicherweise nicht die Tyrosinaseaktivität, sondern noch andere Faktoren die Melaninsynthese solcher Melanosomen begrenzen.

Daß nach Zusatz des 11 000 g Überstandes die zelluläre Melaninsynthese tatsächlich stimuliert wurde, konnte auch durch die Ergebnisse eines Einbau-Experimentes, bei dem die Inkorporation von Leucin ins Protein und von Tyrosin in Protein und ins Melanin verfolgt wurde, gezeigt werden (Tabelle 28). Es zeigte sich hierbei, daß nach 3 tägiger

Inkubation in Gegenwart des Überstandes relativ mehr Tyrosin als Leucin inkorporiert wurde, was darauf hinweist, daß in Übereinstimmung mit den quantitativen Ergebnissen der Melaniningehaltsbestimmung (Abb. 27) relativ mehr Tyrosin für die Melaninsynthese utlilisiert wurde.

Inkubations- zeit	cpm/mg Zellprotein		<u>Tyrosin x 10</u>
	Tyrosin	Leucin	Leucin
1 Tag	7725 [±] 951 (100%)	46 084 [±] 3135 (100%)	1,67
3 Tage	8412 [±] 2240 (109%)	36 683 [±] 10 402 (80%)	2,29

Tab. 28: Einbau von Tyrosin (Melanin und Protein) und Leucin (Protein) von HPM-73 Kulturen nach Zusatz von 11 000 g Überstand über 1 und 3 Tage. Die radioaktiven Aminosäuren wurden jeweils 24 h im Zeitintervall 0-1. Tag und 2.-3.Tag zugesetzt.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, zunächst die beiden verwendeten Zelllinien des HARDING-PASSEY-Melanoms HPM-67 und HPM-73 anhand einiger cytologischer und biochemischer Parameter zu charakterisieren.

Dabei stellte sich heraus, daß die HPM-67 und HPM-73 Zellen, die in ihrem Chromosomenmuster keine signifikante Abweichung zeigten, sich in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und in ihrer Fähigkeit zur Melaninsynthese unterschiedlich verhielten. Während die HPM-67 Zellen sich innerhalb von ca. 40 h verdoppelten, benötigten die HPM-73 Zellen noch etwa 100 h dazu. Ob die Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit in einer direkten Beziehung zur Melaninbildung stehen, d.h. möglicherweise ein bisher unbekannter Mechanismus im Prozeß der Melaninsynthe-

se einen Einfluß auf die Zellreplikation haben kann, oder ob diese antagonistische Beziehung zwischen Proliferation und Melaninsyntheserate nur in einer scheinbaren Korrelation zueinander steht, muß im Augenblick als ungelöstes Phänomen angesehen werden.

Beide Zelllinien zeigten ein erhebliches Maß an aerober Glykolyse, d.h. ein Großteil der verbrauchten Glukose wurde als Laktat ins Medium ausgeschieden. Ferner wurde eine gewisse Menge an Pyruvat von den Zellen gebildet (etwa 3% der Laktatmenge). Die Raten des Glukoseverbrauchs und der Bildung von Laktat und Pyruvat waren bezogen auf gleiche Zellmengen und Inkubationszeiträume nahezu gleich.

Auffällig war auch, daß sie sich in ihrem Aminosäurestoffwechsel in der Hinsicht ähnelten, daß sie beide die Fähigkeit zur Bildung von Alanin und Asparaginsäure besaßen. Während über die Inkubationszeit der Gehalt an allen essentiellen Aminosäuren im Medium abnahm, stieg die Konzentration dieser beiden deutlich an. Damit haben die Zellen anscheinend die Eigenschaft, das im Glukosestoffwechsel zentrale Pyruvat nicht nur durch Reduktion zum Laktat weiter zu verstoffwechseln, sondern auch durch Transaminierung in Alanin oder durch Carboxylierung und Transaminierung zu Asparaginsäure umzuwandeln.

Bei der Berechnung des Aminosäureverbrauchs und der Bildung von Protein innerhalb des gleichen Inkubationszeitraumes fand sich ein wesentlich höherer Verbrauch an Aminosäuren als letztlich ins Protein eingebaut wurde. Unter der Voraussetzung, daß die Zellen etwa 1,2 mg Aminosäuren verbrauchten und im Gegensatz dazu nur 0,24 mg Protein während 19 h neubildeten (Tab. 3) und keinen erheblich höheren Protein-turn-over hatten, als von anderen Kulturzellen bekannt ist (ungefähr 0,5-1% der Pro-

teinsynthese pro Stunde), deutet diese Berechnung darauf hin, daß die Zellen Aminosäuren neben der Proteinsynthese noch für andere Stoffwechselprozesse (Glukoneogenese?) utilisieren.

Ein deutlicher Unterschied der beiden Zelllinien bestand in ihrer Fähigkeit zur Melaninbildung. Während der Melaningehalt (E 400/mg Protein) einer voll bewachsenen Kulturflasche von HPM-73 Zellen bei etwa 1,3 lag, fand sich in den HPM-67 Zellen, bezogen auf gleiche Proteinmengen, nur ca 20% dieser Menge (Tabelle 1).

Eine nachlassende Pigmentproduktion bei pigmentbildenden Zellen unter Proliferationsbedingungen in vitro wurde schon früh beschrieben (EBELING 1924; FISCHER, 1938; WHITTAKER, 1967). Bis heute konnte noch keine eindeutige Erklärung dafür gefunden werden. Eine häufig diskutierte Selektion von anderen - nicht zur Melaninbildung befähigten - Zellen, muß im Fall der HPM-67 Zellen ausgeschlossen werden, da auch hier unter bestimmten Bedingungen (erhöhte Sauerstoffspannung, Serumentzug im Nährmedium) die Melaninsynthese aktiviert werden konnte.

Unter der Vorstellung, daß der begrenzende Schritt für die Melaninsynthese in der Tyrosinase-reaktion zu suchen ist, wurden die Konzentrationen der Faktoren, die für den Ablauf der Tyrosinase-reaktion essentiell sind (Tyrosin, DOPA, Kupfer, Sauerstoff), erhöht. Dabei zeigte sich, daß eine Erhöhung des Tyrosinangebotes im Nährmedium auf das 4 fache bei beiden Zelllinien eine leichte Erhöhung des Melaningehaltes mit sich brachte. Dieser geringe Effekt von 10% spricht jedoch nicht für einen signifikanten Substratmangel.

Zusatz von 10^{-5} M DOPA zum Nährmedium hatte keinen Einfluß auf die Melaninsynthese der HPM-Zellen. Jedoch wurde bei 5×10^{-5} M DOPA eine signifikante Erhöhung (etwa Verdopplung) des Melaningehaltes ge-

funden. Ob diese Stimulation über ein erhöhtes Co-substratangebot für die Tyrosinasereaktion erfolgte, oder möglicherweise auch ein indirekter Einfluß auf den zellulären Melaniningehalt bestand durch eine Autoxidation von DOPA zu Melanin mit folgender Aufnahme, ist im Augenblick eine offene Frage. Jedoch besteht auch für letztere Möglichkeit ein Anhalt, wie anhand der Aufnahme von Melanosomen und Melanin gezeigt werden konnte (siehe 3.6.).

Die gleiche Erklärung könnte auch zutreffen für die Kombination von $10^{-6}M$ Kupfer und $10^{-5}M$ DOPA. In diesem Fall ist die Spontanoxydation des DOPA durch Reduktion des Cu^{2+} zu Cu^{1+} bedeutend höher als bei $10^{-5}M$ DOPA allein. Auch hier könnte phagozytiertes Melanin wieder für eine Erhöhung des Melaniningehaltes verantwortlich sein. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, daß in Gegenwart von Kupfer und DOPA auch intrazellulär mehr Melanin durch Autoxydation gebildet wurde.

Wie schon in der Einleitung beschrieben, ist Sauerstoff direkt für die Hydroxylierung des Tyrosin zum DOPA essentiell. Da die Zellen in ihrem Energiestoffwechsel nicht nur glykolysieren, sondern Sauerstoff auch für die Atmung und die Melaninsynthese benötigen, besteht die Möglichkeit, daß unter in vitro Bedingungen durch die Überschichtung der Zellen mit Nährmedien in der Mikroumgebung der Zellen ein relativer Sauerstoffmangel auftritt, auf Grund mangelnder Nachdiffusion. Da die O_2 -Spannung im Medium abhängig ist vom O_2 -Gehalt in der Atmosphäre, wurde die exogene Sauerstoffkonzentration auf 93% erhöht.

Dabei zeigte sich, daß eine solch hohe Sauerstoffkonzentration im hohen Maße toxisch ist für beide Zelllinien. Für andere Zellen wurden ähnliche Effekte beschrieben.

Die Toxizität kam in der verlangsamten und nach 4

Tagen völlig inhibierten DNS-Synthese und dem relativ hohen Zellverlust zum Ausdruck (Abb. 16 und 17). Sie könnte auf einer Beeinflussung von oxidationsempfindlichen Bestandteilen der Zellmembran oder des Zellinnern (wie Lipide und Proteine) beruhen.

Unter dem hohen Sauerstoffangebot war der Glukoseverbrauch pro Kultur zwar eingeschränkt, andererseits war aber die Umwandlungsrate von Glukose zu Laktat erhöht. Es wurde also wider Erwarten relativ mehr Glukose glykolyisiert. Diese Beobachtung weist darauf hin, daß möglicherweise der Atmungsstoffwechsel, d.h. der O_2 -Verbrauch, inhibitorisch beeinflußt wird. Eine denkbare Möglichkeit wäre z.B. daß durch strukturelle Veränderungen der Zell- bzw. Mitochondrienmembran (Lipidoxydation?) der H_2 -Transport über das in der Glykolyse gebildete $NADH + H^+$ in die Mitochondrien inhibiert ist. Damit stünden in den Mitochondrien keine Reduktionsäquivalente für den Sauerstoff zur Verfügung und im Zytoplasma würde das in der Glykolyse anfallende $NADH + H^+$ dann für die Reduktion von Pyruvat zu Laktat verwendet.

Auffällig war allerdings der unterschiedliche Einfluß von 93% Sauerstoff auf die Melaninbildung in beiden Zellarten. Während es bei den HPM-73 Zellen zu keinem Anstieg kam, erzielte die Behandlung bei den HPM-67 Zellen eine Erhöhung des zellulären Melaningehaltes (Abb. 16). Der biochemische Mechanismus für dieses Phänomen ist bisher ungeklärt.

In einer Stickstoffatmosphäre fehlte, vorausgesetzt, daß wirklich 100% anaerobe Bedingungen vorlagen, das Cosubstrat (Sauerstoff) für die Tyrosinasereaktion. Es kam sehr schnell zum Stop der Melaninsynthese. Die N_2 Umgebung wirkte sich auf den Proteingehalt der Zellkulturen auch bei längerer Inkubation bedeutend weniger toxisch aus, als der 93%ige Sauerstoff, da die Zellen einen Großteil der Energie aus der Glykolyse beziehen können.

Der Serumgehalt des Nährmediums hatte einen deutlichen Einfluß auf das Wachstum und im Falle der Melanomzellen auch auf die Melaninbildung in Zellkulturen. Man weiß, daß das Serum bestimmte Wachstumsfaktoren enthält, die notwendig sind, um Zellen permanent in vitro züchten zu können (FAN u. MITARB., 1973; HEALY u. PARKER, 1966; JAINCHILL u. TODARO, 1970; MORLEY, 1974; SHODELL u. RUBIN, 1970; TOZER u. PIRT, 1964). Bei Entzug von Serum kommt es zu einem Nachlassen der Wachstumsgeschwindigkeit und nach längeren Inkubationszeiten (mehrere Tage) zu einem Absterben der Zellen (CHEN u. SHAW, 1974; DAVIDSON u. YAMAMOTO, 1968; GRIMM, 1972; OEY u. MITARB. 1974).

Im Falle unserer HPM-73 Zellen führte eine Verminderung des Serumgehaltes auf 0,5 % zum Stillstand des Wachstums und über längere Inkubationszeiten auch zu einem allmählichen Verlust an Zellen. Ein vollständiger Serumentzug dagegen führte schon nach eintägiger Inkubation zu einem 25 %igen Zellverlust (Abb. 18). Der starke inhibitorische Einfluß von serumfreiem Medium auf das Wachstum der Zellen konnte auch anhand des Thymidineinbaues gezeigt werden, der schon nach 20 Stunden um 85% vermindert war gegenüber Kontrollkulturen (Abb. 19).

Während die Proliferation in den HPM-Zellen durch Serumentzug inhibitorisch beeinflusst wurde, kam es in Bezug auf den intrazellulären Melaningehalt zu einer Stimulation (Abb. 20) um etwa 70% nach 2 tägiger Inkubation. Diese Erhöhung des Melaningehaltes muß auf eine höhere Tyrosinaseaktivität zurückgeführt werden, wie die Bestimmung der Enzymaktivität auch bestätigte (Tab. 10).

CHEN u. SHAW (1974) beschreiben eine bedeutende Verunreinigung ihrer Melanomzellkulturen mit Fibroblasten, die sich bedeutend schneller vermehrten als die Melanocyten und im Laufe der Zeit in vitro

eine kürzere Verdopplungszeit in ihren Kulturen verursachten. Diese Fibroblasten waren nach ihren Erfahrungen sehr viel anfälliger gegen "Hungerbedingungen", wie sie bei Serumentzug auftreten. Sie gingen sehr schnell zugrunde und in den Kulturen blieben dann nur noch die Melanocyten übrig. Die Melanocyten hatten dann naturgemäß, bezogen auf mg Protein, einen viel höheren Melaniningehalt.

Diese Erklärung kann aber für unsere HPM-73 und HPM-67 Zellen nicht zutreffen. Bei der Annahme, daß ein Vorwiegen von Fibroblasten in den HPM-67 Kulturen ihre bedeutend kürzere Verdopplungszeit verursachten, müßten diese Zellen durch serumfreie Behandlung auch viel stärker geschädigt werden als die HPM-73 Zellen. Dies war aber nicht der Fall, sondern der Proteinverlust und die Verringerung der DNS-Syntheserate war bei den HPM-67 Kulturen sogar geringer als bei den HPM-73 (Tab. 12).

Der Melaniningehalt wurde in den HPM-67 Zellen bei 0,5% oder 0% Serum im Nährmedium bei 3tägiger Inkubation mehr als verdoppelt und konnte auch bei Zusatz von Theophyllin und Dibutyryl-cAMP nicht mehr wesentlich beeinflußt werden. Damit bleibt bisher die Frage offen, ob diese Zellen resistent gegen exogenes cAMP sind. Den Anstieg des intrazellulären cAMP Gehaltes nach Kultivierung von Zellen in serumfreiem Nährmedium beschrieben OEY(1974), GRIMM u. FRANKE (1972) u.a.

Die wichtige Rolle des cAMP in Bezug auf Wachstumsverhalten und Ausprägung differenzierter Funktionen in Zellen ist schon Gegenstand vieler Arbeiten gewesen (CHO-CHUNG, 1974; FURMANSKI u. MITARB., 1971; JOHNSON u. MITARB. 1971; JOHNSON u. PASTAN, 1972; PRASAD u. HSIE, 1971; VARGA u. MITARB. 1974). In Tumorzellen findet man im Vergleich zu Normalzellen verhältnismäßig niedrige cAMP Spiegel. Eine künstliche Erhöhung des intrazellulären cAMP Gehaltes führte bei einigen Krebs-

zellen zum Wiederauftreten von Kontaktinhibition - einer für Normalzellen typischen Funktion (FURMANSKI u. MITARB. 1971; JOHNSON u. MITARB., 1971).

Außerdem kommt es unter der Einwirkung von cAMP häufig zu deutlichen morphologischen Veränderungen und zu Änderungen im Wachstumsverhalten (CHO-CHUNG, 1974; FURMANSKI u. MITARB., 1971; JOHNSON u. MITARB.; 1971, JOHNSON u. PASTAN, 1972; PRASAD u. HSIE, 1971; VARGA u. MITARB., 1974). Die Gestalt mancher Tumorzellen in Kultur ähnelt nach cAMP Behandlung derjenigen von Normalzellen (nicht Tumorzellen) (JOHNSON u. MITARB., 1971). Nach Absetzen von cAMP wurde je nach Zellart verschieden die tumorzellencharakteristische Gestalt wieder mehr oder weniger schnell erreicht. JOHNSON u. MITARB. (1971) und RYAN u. HEIDRICK (1968) berichten von einer Wachstumsinhibition durch cAMP bei verschiedenen Tumorzellen, die bei den Normalzellen (nicht transformierten) desselben Gewebes nicht auftritt. Eine Inhibition des Zellwachstums und die Stimulierung der Melaninsynthese an Melanomzellen und die Ausbildung von Neuriten an Neuroblastomzellen unter cAMP-Behandlung wurde beschrieben (FURMANSKI u. MITARB., 1971; JOHNSON u. PASTAN, 1972; KREIDLER u. MITARB., 1973).

Auch im Falle der HPM-73 Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit ein Einfluß von exogenem cAMP bzw. Theophyllin und cAMP in Bezug auf die Melaninsynthese und das Wachstum nachgewiesen werden.

Messung der DNS-Syntheserate nach Anwendung von Theophyllin und cAMP über 3 Tage ergab, daß diese relativ stark inhibiert wurde (etwa 70%). Messung des durchschnittlichen Proteingehaltes pro Kultur (Wachstum) zeigte, daß das Wachstum unter der Behandlung zum Stillstand kam und ein allmählicher Proteinverlust einsetzte (Tab. 7 und 8).

Beim Zusatz von cAMP kam es zu einem intrazellulären Anstieg des cAMP-Gehaltes. Er lag in

exponentiell wachsenden Kulturen bei 0,55 mol/mg Zellprotein (= 100%). Er ließ sich durch Zusatz von 5×10^{-4} M Theophyllin und cAMP zum Nährmedium auf 260% erhöhen. Ein zusätzlicher Serumentzug verursachte noch eine leichte Steigerung auf 290% (Tab. 9).

Bei den Kulturen mit erhöhtem cAMP Gehalt wurde auch eine stimulierte Tyrosinaseaktivität gefunden (Tab. 10). Bloßer Serumentzug erhöhte die Tyrosinaseaktivität auf etwa 140% im Vergleich zu 100% der Kontrollkulturen (10% Serum). Theophyllin und d.b.-cAMP in 10% serumhaltigem Medium steigerten die Enzymaktivität auf 210%. Die Kombination von Serumentzug und cAMP Anwendung bewirkte etwa eine Vervierfachung des Effektes von serumfreiem Nährmedium.

Diese Kulturen mit erhöhtem cAMP Gehalt und gesteigerter Tyrosinaseaktivität zeigten auch einen erhöhten Melaniningehalt. Es trat zwar keine strenge Parallelität auf zwischen cAMP Gehalt und Tyrosinaseaktivität auf der einen Seite und Melaniningehalt auf der anderen Seite, jedoch könnte dennoch eine solche Parallelität bestehen, die unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht offensichtlich wurde. Wenn eine sequentielle Beziehung besteht zwischen Erhöhung des cAMP Gehaltes, Steigerung der Tyrosinaseaktivität und Anstieg des Melaniningehaltes, muß in weiteren Experimenten mit Kurzzeitwerten nach diesen Veränderungen gesucht werden. In den durchgeführten Experimenten war jedenfalls auffällig, daß unter Anwendung von cAMP (Theophyllin) eine Aktivierung der Tyrosinase auftrat. So ist es wahrscheinlich, daß der erhöhte Melaniningehalt der Kulturen in einem ursächlichen Zusammenhang mit der Stimulierung der Tyrosinase steht. Ungeklärt ist bisher, weshalb die Kombination von serumfreiem Medium und cAMP (+ Theophyllin) Behandlung bezüglich der Melaninbildung zu einem stärkeren

Effekt führte, als durch bloße Addition der Einzeleffekte erklärbar wäre. Da bekannt ist, daß Serum essentiell ist für die Zellproliferation, könnte von Bedeutung sein, daß es bei Entzug des Serums bei proliferationsinhibierten Kulturen, bei denen die Neusynthese von Nukleinsäuren und Proteinen weitgehend blockiert ist (Tab. 7, 8, 12), noch andere Mechanismen geben könnte, die zu einer Aktivierung des Melaninsynthese-Apparates führen könnten (präferenzielle Interferenz zwischen Abbau eines Tyrosinaseinhibitors und Neusynthese von Melanin). In diesem Zusammenhang müßte daran gedacht werden, daß nur in proliferierenden Kulturen ein Inhibitor der Melaninsynthese (Tyrosinaseinhibitor) synthetisiert wird, während es in stationären Kulturen zu einem Abbau des Inhibitors kommen könnte.

Wie schon in der Einleitung beschrieben, bewirkt auch Cholera toxin eine Erhöhung des intrazellulären cAMP Gehaltes, da das Toxin durch bestimmte Rezeptoren zunächst an die Zelle gebunden wird und dann über einen unbekannten Mechanismus die Adenylatzyklase in der Zellwand stimulierend beeinflusst (WIEGANDT u. MITARB., 1974; VAN HEYNINGEN, 1974). Bei erhöhter Adenylatzyklaseaktivität steigt der intrazelluläre cAMP Spiegel an.

Wir versuchten diese Ergebnisse zu reproduzieren und die Auswirkungen auf den Melaningehalt zu überprüfen. Wegen einer möglichen Bindung von Cholera toxin an Serumproteine oder -lipide wurde Cholera toxin ($1 \mu\text{g/ml}$) den Zellen nur zusammen mit serumfreiem Medium angeboten. Bei Inkubation bis zu 3 Tagen konnte jedoch durch Cholera toxin allein kein Einfluß auf die Melaninsynthese gefunden werden. Diese Tatsache führte zu der Vermutung, daß an den HPM-Zellen keine oder zu wenige ("verborgene") Gangliosidrezeptoren vorhanden sind. Um diese Hypothese zu testen, wurden Ganglioside GM_1 und GM_3 , die uns aus dem Arbeitskreis von Prof. Wiegandt

zur Verfügung gestellt wurden, den Kulturen zugesetzt ($20 \mu\text{g/ml}$). Dabei zeigte sich, daß Ganglioside allein keinen Einfluß hatten, jedoch die Kombination mit Choleratoxin nach dreitägiger Inkubation zu einem signifikanten Anstieg (Verdopplung) des Melaningehaltes führte.

Da in vivo die Melanogenese der hormonellen Kontrolle des MSH unterliegt (BITENSKI u. BURSTEIN, 1965; VARGA u. MITARB., 1974), wobei der "second messenger" des MSH auch das cAMP ist, wurde in diesem Zusammenhang auch der Einfluß von α - und β -MSH auf die Melanogenese der HPM-73 Kulturen getestet. Dabei konnten in Konzentrationen von 0,1-1000 ng/ml in serumfreiem, 0,5% serumhaltigem und 10% serumhaltigem Nährmedium bei Inkubationen über 3 Tage keine melanogenen Effekte erzielt werden. Unter der Voraussetzung, daß die Befunde von VARGA (1974) zutreffen, daß im Falle von S 91 Cloudman Melanomzellen spezielle Rezeptoren für das MSH vorhanden sind, ist eine wahrscheinliche Erklärung für die negativen Befunde bezüglich der MSH-Wirkung auf die HPM-73 Zellen die, daß diese eine andere Oberflächenstruktur (nicht vorhandene oder "verborgene" MSH-Rezeptoren) besitzen, worauf auch die negativen Befunde hinsichtlich der Cholera-toxin-Wirkung deuteten.

Aus der Medizin sind nur wenige Substanzen bekannt, die einen Effekt auf die Melanogenese haben. Von einer Substanz, nämlich dem Resochin = Chloroquin, sind im Zusammenhang mit der Malariabehandlung seit längerer Zeit sowohl melanogene als auch amelanogene Effekte beschrieben worden.

Resochin hat eine starke Affinität zu melaninhaltigen Zellen, was auf die Fähigkeit des Melanins zurückzuführen ist, Elektronen leicht abzugeben oder aufzunehmen (SAMS, 1967). Diese Speicherung von Resochin im melaninhaltigem Gewebe macht man

sich bei der Diagnose von Melanomen mit radioaktiv markiertem Resochin zunutze (BEIERWALTES u. MITARB., 1968; BOYD u. MITARB., 1971; KIM u. MITARB., 1973).

Die Bindung von Resochin an Melanin führt zu einer "Verklumpung" des Melanins (SAMS, 1967). Weiterhin ist von Resochin bekannt, daß es die Membraneigenschaften von Zellen beeinflusst sowohl im Sinne einer Stabilisierung der Lysosomenmembran als auch einer Labilisierung der Plasmamembran (BEDOYA, 1970; SAMS, 1967; VAN WOERT, 1971). Da von MENON u. HABERMANN (1970) ein direkter Einfluß auf die Tyrosinase durch Membran-"labilisierende" - Agenzien (Triton X 100, Einfrieren und Auftauen, Osmotischer Schock, Blockade SH-haltiger Membranstrukturen durch Schwermetallionen) beschrieben wurde, ist auch im Zusammenhang mit den melanogenen oder amelanogenen Wirkungen von Resochin an solche Membraneffekte zu denken.

Von Chloroquin ist ferner bekannt, daß es an die DNS gebunden wird, die DNS-Polymerase hemmt und möglicherweise auch die DNS-Synthese der Zellen hemmt (GOODMAN u. GILMAN, 1975). In Konzentrationen höher als $10^{-5}M$ wird das Wachstum von Mikroorganismen (Plasmodien) und Säugetierzellen gehemmt. Es ist auch eine Inhibierung des Phosphateinbaus in die RNS beschrieben und eine Hemmung der DNS abhängigen RNS Polymerase. Ob die toxischen Effekte von Resochin auf Pigmentzellen auf die oben beschriebene Veränderung der Pigmentbildung oder auf die Beeinflussung der Nukleinsäure-Synthese zurückzuführen sind, ist unseres Wissens nach noch ungeklärt.

Nach den bisherigen Wissen ist wahrscheinlich, daß die melanogenen und cytotoxischen Effekte des Chloroquins durch unterschiedliche Mechanismen erzielt werden. Bei den cytotoxischen Effekten müßte

insbesondere an die erwähnte Wirkung auf die Nukleinsäuresynthese gedacht werden, während die melanogenen Effekte des Resochins wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Bindung an melaninhaltige Strukturen und möglicherweise mit der Veränderung von Membranstrukturen mit folgender Beeinflussung des Tyrosinasesystems gesehen werden müssen.

Um herauszufinden, ob die Effekte des Resochin auf die Melanogenese auch *in vitro* (Kultur) nachvollzogen werden können, wurde die Wirkung von Resochin (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) an unseren HPM-73 Zellen untersucht. Dabei traten nach 3-tägiger Inkubation nur melanogene Effekte auf. Wir fanden schon bei 10^{-6} M eine starke Erhöhung des Melaningehaltes (von 100 auf 680%). Bei 10^{-5} M Chloroquin trat jedoch zusätzlich zur Stimulierung der Melaninbildung auch eine signifikante Hemmung der DNS Synthese auf (Tab. 15 und 16). 10^{-4} M Chloroquin führte schon nach einem Tag zu vollständigem Zellverlust.

Die Literaturbefunde und unsere Ergebnisse geben Hinweise für eine mögliche Erklärung der melanogenen Eigenschaften des Resochin. Die melanogene Wirkung könnte zum einen auf Membranveränderungen zum anderen auf einer Blockierung von SH-haltigen Gruppen in Melanomzellen mit einer folgenden Stimulierung der Tyrosinaseaktivität zurückzuführen sein. Bei einer Anlagerung von Resochin an freie SH-Gruppen (BEDOYA, 1970) werden diese blockiert, wodurch nach DAVIDSON u. YAMAMOTO (1968) ein Inhibitor der Tyrosinase inaktiviert werden soll. Welcher Mechanismus an unseren *in vitro* Kulturen für den Effekt des Chloroquins auf die Melanogenese verantwortlich ist, muß durch zukünftige experimentelle Untersuchungen geklärt werden.

Wie schon beschrieben, stammen unsere HP-Melanomzellen von dem spontan entstandenen, melaninbildenden

Tumor (Melanom) am Ohr einer Maus, den HARDING und PASSEY im Herbst 1925 isolierten. Der Tumor bestand zur Hauptsache aus neoplastischen Melanocyten und Makrophagen. Weil dieser Tumor mit großer Wahrscheinlichkeit aus den epidermalen Hautmelanocyten entstand, läßt sich eine Beziehung zur Funktion der epidermalen Melanocyten vermuten.

Da die epidermalen Melanocyten bekanntlich die Fähigkeit zur Abgabe von Melanin in die Keratinoocyten besitzen, ergibt sich die Frage, ob auch die Melanocyten des HP-Melanoms dazu in der Lage sind. Insbesondere ist von Interesse, ob solche Melanocyten ihre Granula nur an Nicht-Melanocyten abgeben oder ob sie auch die Fähigkeit besitzen, sich gegenseitig zu beimpfen, bzw. ob Melanocyten in der Lage sind, solche Granula aufzunehmen.

Da Zellkulturen sich zur Analyse solcher zellulärer Prozesse (Phagozytose und Pinocytose) besonders gut eignen, sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob die HPM-73 Melanomzellen die Fähigkeit zur Aufnahme exogener Melanosomen (Phagozytose) oder Tyrosinase (Pinocytose) oder den Kulturmedien zugesetzten Melanins (Phagozytose) haben.

Zur Gewinnung dieser Komponenten wurde nach der Methode von SEIJI u. MITARB. (1963) HPM in vivo Gewebe fraktioniert und daraus zunächst die Melanosomen in reiner Form isoliert (siehe Abschnitt 3.6.1.). Wie bereits bei SEIJI beschrieben, zeigten die durch Saccarose-Gradienten-Zentrifugation erhaltenen 5 Fraktionen zur Hauptsache nur in der 2. (von oben) Succinoxidase- und Glutamatoxidaseaktivität (Mitochondrienfraktion), während nur in den unteren Fraktionen Tyrosinaseaktivität zu finden war (Melanosomenfraktion). Auch durch elektronenmikroskopische Überprüfung konnte in unserer Melanosomenfraktion die Freiheit von Mitochondrien gezeigt werden (Abb. 22).

Unsere Überprüfung der prozentualen Verteilung der Tyrosinaseaktivität in den einzelnen Fraktionen brachte jedoch ein von SEIJI's Befunden etwas abweichendes Ergebnis. In SEIJI's Arbeit enthielt die ursprüngliche "Kernfraktion" fast ein Drittel der insgesamt vorhandenen Tyrosinaseaktivität, erst nach weiterer Reinigung fand sich in der Kernfraktion nur noch ca. 5% der Tyrosinaseaktivität. Da wir wahrscheinlich öfter als SEIJI, nämlich mit 20 Potterschlägen das Gewebe homogenisierten, war in unserem Fall das Gewebe so weitgehend homogenisiert, daß ohne weitere Bearbeitung die Kernfraktion nur noch 4% der Tyrosinaseaktivität enthielt.

Ferner fand SEIJI in der großen-Granula-Fraktion 42% der insgesamt vorhandenen Tyrosinase, 19% in der kleinen-Granula-Fraktion und 11% in der löslichen Fraktion, während bei unserer Aufarbeitung nur 16% in der großen-Granula-Fraktion 68% in der kleinen-Granula-Fraktion und 12% in der löslichen Fraktion gefunden wurden (Tab. 17). Diese Unterschiede könnten einmal darauf beruhen, daß im Falle unseres HP-Melanoms (im Vergleich mit dem von SEIJI verwendeten B 16 Melanom) relativ mehr wenig melanisierte (leichte) Melanosomen vorhanden sind, die sich bei 11 000 g nicht abzentrifugieren lassen, oder aber, daß im Falle von SEIJI durch den geringeren Homogenisierungsgrad Anteile im 11 000 g Niederschlag zu finden waren, die bei unserer Aufarbeitung im Überstand verblieben.

Um die mögliche Fähigkeit von Melanomzellen zur Aufnahme von Melanosomen verfolgen zu können, wäre es besonders vorteilhaft, diese in Form markierter Partikel einzusetzen. Deshalb wurden zwei Experimente durchgeführt, in denen versucht wurde, Melanosomen radioaktiv zu markieren, einmal in vivo und einmal in vitro. Beide Versuche gelangen.

Bei der in vivo Methode war das Ergebnis jedoch nicht sehr befriedigend. Auch nach mehrmaliger intraperitonealer Injektion von ^{14}C -Tyrosin (645 μg , 15 μCi) waren letztlich die Melanom-Melanosomen nur schwach markiert. Eine Erklärung dafür wäre, daß aufgrund der Resorptionsroute (i.p. $\rightarrow$ Leber, etc.) relativ wenig Tyrosin in den arteriellen Kreislauf gelangt ist und damit die spezifische Aktivität des Tyrosins gering war.

Bei der Untersuchung der Melanosomen zeigte sich, daß das Tyrosin sowohl in das Matrixprotein und die Tyrosinase als auch in das Melanin eingebaut worden war. Von der insgesamt gefundenen Radioaktivität in den Melanosomen waren 28% im Protein- und 72% im Melaninanteil.

Durch die in vitro Markierung der Melanosomen mit ^{14}C -Tyrosin gelang es, zu bedeutend höher markierten Melanosomen zu kommen bei bedeutend kleineren Mengen an eingesetzter Radioaktivität (72 μg , 1 $\mu\text{Ci/ml}$). Bei dieser in vitro Markierung wurde das Tyrosin nur in den Melaninanteil eingebaut.

Das bei der in vitro-Markierung der Melanosomen mit ^{14}C -Tyrosin auftretende Plateau (Tab. 20) nach etwa 5 h im Einbau von Tyrosin ins Melanin trat unabhängig voneinander bei mehreren Markierungsversuchen auf und ließ zunächst einen Substratmangel vermuten. Aber auch eine 10-fache Erhöhung des Tyrosinangebotes im Inkubationspuffer konnte das Abflachen der Kurve nach 5 h nicht verhindern. Möglicherweise ist dieses Verhalten mit einer Inaktivierung der Tyrosinase zu erklären. Die Plateauphase trat sowohl im Falle von Melanosomen als auch im Falle von Überstand ("lösliche" Tyrosinase) auf.

In vorläufigen Experimenten wurde gefunden, daß diese Inaktivierung nach Einfrieren (-20°) und wieder

Auftauen der tyrosinasehaltigen Fraktionen nicht auftrat, sondern zumindest über einen Zeitraum von 18 h kein Tyrosinaseaktivitätsverlust vorhanden war. Deswegen lassen wir uns von der Arbeits-hypothese leiten, daß für das Eintreten der Plateau-phase die Aktion eines Inhibitors verantwortlich ist. Dieser Inhibitor könnte durch das Einfrieren und Auftauen inaktiviert werden.

Diese sowohl in vivo als auch in vitro - mit ¹⁴C-Tyrosin markierten Melanosomen wurden den Nährmedien der Zellkulturen zugesetzt und die HPM-Kulturen unterschiedlich lange damit inkubiert. Dabei stellte sich heraus, daß die Radioaktivität ("Melanosomen") von den Zellen sehr schnell aufgenommen wurde. Es zeigte sich, daß in der Anfangsphase (erste 5 h) die Aufnahme mit einer erheblich schnelleren Rate geschah, während dann nach weiterer Inkubation mit diesen markierten Melanosomen nur noch eine erheblich verlangsamte Aufnahme festzustellen war (Abb. 23). Es ist wahrscheinlich, daß es sich hierbei um Aufnahme von ganzen Melanosomen und nicht um Aufnahme von Abbau-Proteinen handelte, weil einerseits bei Verwendung der in vivo markierten Melanosomen die Radioaktivität sowohl im Protein - als auch im Melaninanteil der Zellen wiedergefunden wurde und andererseits die Melanosomen-Aufnahme zu charakteristischen Veränderungen des Zellstoffwechsels im Sinne einer Melanisierung führte.

Parallele lichtmikroskopische Beobachtungen bestätigten den Eindruck, daß die Melanosomen von HPM-Zellen aufgenommen wurden (Abb. 24 und 25). Dabei zeigte sich, daß nach etwa 2 Tagen große stark melaninhaltige "Rundzellen" auftraten, die in ihrem Erscheinungsbild Melanophagen ähnelten. Wir nehmen an, daß diese Zellen (Melanophagen) Zellen mit besonders viel phagozytierten Melanosomen darstellten.

Die Aufnahme der Radioaktivität (Melanosomen) in 2 Phasen könnte dadurch zu erklären sein, daß diese Partikel von den Zellen relativ schnell aufgenommen wurden, bis in den Zellen gewissermaßen eine Melanosomensättigung erreicht war. Die weitere Aufnahme von Melanosomen beruhte dann möglicherweise auf einer morphologischen Umwandlung bestimmter Kulturzellen zu den gezeigten "Rundzellen", die dann in der Lage waren, kontinuierlich weitere Melanosomen aufzunehmen.

Mit den aufgenommenen Melanosomen wurde nicht nur Melanin sondern auch aktive Tyrosinase in die Zellen eingeschleust. So zeigten Zellen, die mit Melanosomen zusammen inkubiert wurden, einen deutlich höheren Melaniningehalt. Auch nach Abzug des Melanins der inkorporierten Melanosomen blieb die E 400/mg Protein der behandelten Kulturen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit höher als bei Kontrollkulturen. Der zelluläre Melaniningehalt nach Zusatz von Melanosomen stieg nach einer einstündigen Verzögerungsphase deutlich an und erhöhte sich kontinuierlich. Nach etwa 2-3 Tagen verlief die Kurve des Melaniningehaltes in den behandelten Kulturen parallel der Kurve der Melanosomenaufnahme (Abb. 23). Dieser Befund läßt darauf schließen, daß die Tyrosinase der aufgenommenen Melanosomen für die Zellen zunächst einmal verfügbar werden muß (1 h Verzögerungsphase), und dann in den Zellen durch die zusätzliche Tyrosinaseaktivität eine verstärkte Melaninsynthese einsetzt.

In einem weiteren Experiment wurde gezeigt, daß diese Radioaktivität (Melanosomen) von den Zellen wirklich fest inkorporiert und nicht etwa adsorbiert wurde. Dazu wurden die HPM-Kulturen 2 Tage mit radioaktiv markierten Melanosomen praeinkubiert und anschließend in melanosomenfreiem Medium weitergezüchtet. Dabei zeigte sich, daß die nach 2 Tagen

in den Kulturen vorhandene Radioaktivität auch nach 8 Tagen noch erhalten war (Abb. 26). Parallel zu diesen Befunden lief auch der Melaniningehalt dieser Kulturen. Er war nach 2 Tagen mehr als verdoppelt im Vergleich zu Kontroll-Kulturen (-Melanosomen), nahm aber nach Weiterinkubation in melanosomfreiem Medium nicht mehr zu, was so zu erklären wäre, daß keine weitere Tyrosinase über die Melanosomen den Zellen mehr zugeführt wurde.

Daß dieser Vorgang der Melanosomenaufnahme metabolische Energie erfordert und nicht auf bloßer Adsorption beruht, konnte auch gezeigt werden, wobei die Kulturen 30 Minuten lang bei 0° mit Melanosomen inkubiert wurden. Nach der Aufarbeitung fand sich keine Radioaktivität in den so behandelten Zellen.

Da die HPM-Zellen während der Proliferationsphase relativ wenig Melanin bildeten und diese Kulturen in Gegenwart von serumfreiem Nährmedium erheblich mehr Melanin bildeten, stellte sich die Frage, ob möglicherweise auch das Serum einen Effekt auf den Vorgang der Melanosomen-Aufnahme hat. Ferner war die Frage, ob dieser Phagozytosevorgang eventuell abhängig ist vom Zellzyklus, bzw. ob es Unterschiede zwischen stationären und proliferierenden Zellen gibt. Da gezeigt wurde, daß im serumfreien Medium die Zellen schon nach sehr kurzer Zeit die Proliferation einstellen ohne abzusterben, wurde der Serumentzug als Mittel zum Erzielen eines solch stationären Zustandes benutzt.

Dabei zeigte sich, daß die Aufnahme von Melanosomen bezogen auf mg Protein sehr ähnlich war bei Inkubation in 0% und 10% serumhaltigem Medium. Der Entzug von Serum schien damit keinen Einfluß zu haben auf das Phagozytoseverhalten der Zellen (Tab. 21).

Um herauszufinden, inwieweit die zelluläre Aufnahme von Melanosomen ("Phagozytose") von der zellu-

lären oxydativen ATP-Bildung abhängig ist, wurde ein Melanosomenaufnahmeexperiment in Gegenwart von 2, 4, -Dinitrophenol, eines Entkopplers der oxydativen Phosphorylierung, durchgeführt. Unter dieser Behandlung konnte gezeigt werden, daß nach einem Tag die Melanosomenaufnahme etwa 20% verringert war gegenüber Kulturen, die nur mit Melanosomen ohne DNP behandelt wurden. Nach weiterer Inkubation in Gegenwart von DNP über einen längeren Inkubationszeitraum (3 Tage) wurde keine weitere Radioaktivität (Melanosomen) mehr aufgenommen (Tab. 23).

In der Annahme, daß die HPM-Zellen die dem Kulturmedium zugesetzten Melanosomen phagozytiert haben, könnte die Aufnahmehemmung so interpretiert werden, daß zumindest ein Teil der Energiebereitstellung für diesen Transportprozeß, ähnlich wie bei dem Phagozytoseverhalten von Leukozyten gezeigt werden konnte (KARNOVSKY, 1967), über die Bereitstellung von mitochondrialem ATP abläuft. Ob die nach längerer Inkubationszeit in Gegenwart von DNP vollständige Hemmung der Aufnahme von Melanosomen nur auf die Hemmung der oxydativen ATP-Bildung oder noch auf zusätzliche toxische Effekte zurückzuführen ist, kann im gegenwärtigen Stand der Untersuchungen nicht entschieden werden.

Die bisher beschriebenen Befunde hinsichtlich der Aufnahme von Melanosomen durch HPM-73 Zellen könnten so interpretiert werden, daß die nach der Melanosomen-Aufnahme nachgewiesene Melaninsynthese entweder durch die mit den Melanosomen aufgenommene Tyrosinase bewirkt wurde oder daß die exogenen Melanosomen intrazellulär zu einer Aktivierung der zellständigen "Melaninsynthesemaschinerie" geführt haben. Im letzteren Fall müßte daran gedacht werden, daß intrazellulär entweder die Neusynthese von Tyrosinase induziert wurde oder daß eine Aktivierung praexistenter (inaktiver) Tyrosinase erfolgt ist. Im Falle einer Aktivierung praexistenter Tyrosinase

wäre an eine Inaktivierung eines möglichen Inhibitors der Melaninsynthese (Tyrosinase) zu denken. Im Augenblick neigen wir mehr dazu anzunehmen, daß die (mit den Melanosomen) aufgenommene Tyrosinase für die Auslösung der zellulären Melaninsynthese den Hauptfaktor darstellt. Diese Annahme wird insbesondere dadurch gestützt, daß Hinweise für eine Proportionalität zwischen Tyrosinaseaktivität der zugesetzten Melanosomen und dem Ausmaß der induzierten Melaninsynthese bestehen.

Um abzuklären, ob auch nicht partikelgebundene Tyrosinase ("lösliche") von den Zellen aufgenommen werden kann, wurden die Kulturen in Gegenwart eines 100 000 g Überstandes (lösliche Tyrosinase) inkubiert. Wir fanden, daß auch dabei der Melaningehalt der behandelten Kulturen signifikant (50%) zunahm. Jedoch zeigte sich dabei, daß dieser melaninsynthese-stimulierende Effekt relativ geringer war als bei der Inkubation mit melanosomegebundener Tyrosinase.

Daß partikelgebundene Tyrosinase stärker stimulierend wirkt, zeigt auch ein Experiment, in dem 11 000 g Überstand verwendet wurde, der etwa 70% der insgesamt vorhandenen Tyrosinaseaktivität enthielt. Er führte zu einer etwa 15 fachen Erhöhung der Melaninsynthese gegenüber der Wirkung von 100 000 g Überstand (Abb.27). Da hier der Anteil der Tyrosinaseaktivität nur etwa 5 fach höher war, deuten auch diese Ergebnisse darauf hin, daß die partikelgebundene (11 000 g Überstand) im Vergleich zur löslichen Tyrosinase (100 000 g) entweder "bevorzugt" von den Zellen aufgenommen wurde oder daß sie intrazellulär eine relativ erhöhte Aktivität entfalten kann.

Da die bisherigen Befunde dafür sprechen, daß eine gewisse Praedeletion für die Aufnahme von Melanosomen im Vergleich zu freier Tyrosinase besteht, erhob sich auch die Frage, ob freies Melanin von den Zellen aufgenommen werden kann. Zu diesem

Zweck wurde aus Melanosomen, die im Melaninanteil mit radioaktivem Tyrosin markiert waren, nach saurer Hydrolyse des Proteinanteils das Melanin isoliert und durch Ultraschallbehandlung in etwa $1\mu\text{m}$ große Partikel zerkleinert und dann den Kulturen zugesetzt (Tab. 27).

Dabei wurde gefunden, daß isoliertes Melanin innerhalb der ersten 3 Tage von den Zellen aufgenommen wurde. Danach kam es auf konstante Zellproteinmenge bezogen zu keiner weiteren Aufnahme mehr. Der Melaningehalt der Kulturen stieg zwar nach Inkubation mit Melanin stark an, berechnete man jedoch aufgrund der eingebauten Radioaktivität die Menge des aufgenommenen Melanins und subtrahierte diese vom insgesamt in den Zellen vorhandenen Melanin, so ergaben sich im Vergleich zu Kontrollkulturen ähnliche Melaningehalte. In diesem Falle wurde also nur das von außen angebotene Pigment von den Zellen aufgenommen und es kam in den Zellen zu keiner Stimulation der Melaninsynthese, wie sie bei der Inkubation mit Melanosomen (Melanin + Tyrosinase) beobachtet werden konnte.

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die HPM-Zellen in der Lage sind, sowohl Melanosomen als auch Melanin und Tyrosinase aufzunehmen (wahrscheinlich über einen Vorgang der Endocytose). Dabei führt nicht nur das aufgenommene Melanin zu einer direkten Erhöhung des Melaningehaltes der Zellen, sondern es kommt auch noch zu einer zusätzlichen Stimulierung der zellulären Melaninsynthese im Falle der Behandlung mit Tyrosinase, insbesondere bei Inkubation mit Melanosomen und in geringerem Maße bei Inkubation mit löslicher Tyrosinase. Da wir inzwischen Hinweise für eine Korrelation zwischen Melaninsynthese - stimulierender - Aktivität der Melanosomen und deren Tyrosinaseaktivität haben, vermuten wir, daß die mit den Melanosomen aufgenommene

Tyrosinase der entscheidende Faktor für die Auslösung der zellulären Melaninsynthese ist.

Weitere Untersuchungen sollen insbesondere dem Problem der Zellspezifität dieses Endocytosevorganges (Melanomzell-spezifische Aufnahme) gelten, weil damit unter Umständen neue Möglichkeiten zum Angriff von Melanomzellen (durch Kopplung von chemotherapeutischen Substanzen an die Melanosomen) gegeben wären.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Teil der Einfluß von verschiedenen Agenzien auf die Melaninsynthese von 2 Zelllinien des HARDING-PASSEY-Melanoms, HPM-67 und HPM-73, in Monolayer Kultur untersucht. Als Nährmedium diente Basal Medium Eagle, daß mit 10% foetalem Kalbsserum und Penicillin (100 IE/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) supplementiert war.

Diese beiden verschieden lange in Kultur gezüchteten Zelllinien (HPM-67 seit 1967 und HPM-73 seit 1973) wiesen ein ähnliches Chromosomenmuster auf, zeigten beide eine vergleichbare Rate an aerober Glykolyse und hatten die Fähigkeit zur Bildung und Ausscheidung ins Nährmedium von Pyruvat, Alanin und Asparaginsäure.

Unterschiedlich verhielten sie sich in Bezug auf das Wachstum und die Menge der zellulären Melaninsyntheserate. Die durchschnittliche Verdopplungszeit, gemessen an der Vermehrung des Proteingehaltes, von Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase war bei HPM-73 mehr als doppelt so lang als bei HPM-67. Die HPM-67 enthielten in der stationären Wachstumsphase etwa 20% der Menge an Melanin,

die in den HPM-73 Zellen zu finden war.

Die Melaninsynthese war in beiden Zelllinien um 20 - 100% zu stimulieren durch Erhöhung der Tyrosinkonzentration im Nährmedium und Zusatz von $5 \times 10^{-5} \text{M}$ DOPA oder 10^{-6}M Kupfer + 10^{-5}M DOPA. Auch eine Erhöhung der exogenen Sauerstoffspannung hatte einen Einfluß im Falle von HPM-67 Zellen (jedoch nicht von HPM-73 Zellen) auf den Melanin-gehalt der behandelten Kulturen. Allerdings konnte dieser Effekt nur bei extrem hoher Sauerstoffspannung erreicht werden, die in beiden Kulturen zu einer Hemmung des Wachstums und letztlich zu einem Absterben der Zellen führte.

Serumentzug (0% oder 0,5% Serumgehalt des Kulturmediums) führte zu einer Inhibition der DNS-Synthese und der Proteinzunahme, während die Tyrosinaseaktivität und die Melaninsynthese stimuliert wurden.

Zusatz von dibutyryl-cAMP in Kombination mit Theophyllin (je $5 \times 10^{-4} \text{M}$) brachte eine Stimulierung der Melanogenese, während die Zellproliferation inhibiert wurde. Dabei stieg auch der intrazelluläre cAMP-Gehalt etwa um den Faktor 3 an gegenüber unbehandelten Kulturen.

Eine Kombination von serumfreiem Medium mit d,b,-cAMP (+ theophyllin) ergab den stärksten melanogenen Effekt, der bedeutend höher lag als die addierten Einzeleffekte.

Choleratoxin ($1 \mu\text{g/ml}$), das nach CUATRECASAS zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes und der Melaninsynthese führt, zeigte an HPM-73 Kulturen keinen Effekt auf die Melanogenese, jedoch erbrachte die Kombination mit Gangliosid G_1 ($20 \mu\text{g/ml}$), das möglicherweise den physiologischen Rezeptor für Choleratoxin an der Zelloberfläche darstellt, eine Erhöhung des Melaningehaltes in den HPM-Zellen.

Die Melanocyten-stimulierenden-Hormone α - und β MSH hatten in Konzentrationen von 0,1 - 1000 ng über einen Zeitraum von 3 Tagen in serumhaltigem und serumfreiem Medium bei unseren Zellen keinen Einfluß auf die Melaninsynthese. Der fehlende Effekt von MSH auf die Melanogenese ließe sich ähnlich wie im Falle des Choleratoxins durch einen "Mangel" an MSH Rezeptoren an der Zelloberfläche erklären.

Chloroquin, von dem in der Literatur sowohl melanogene als auch amelanogene Effekte beschrieben sind, führte im Falle der HPM-73 Zellen zu einer starken Erhöhung des zellulären Melanin gehaltes in Konzentration von 10^{-5} und 10^{-6} M.

Im 2. Teil der Arbeit sollte das Endocytoseverhalten (Phagocytose und Pinocytose) der HPM-73 Zellen untersucht werden anhand einer möglichen Aufnahme von Melanosomen, Tyrosinase und Melanin. Dazu wurden diese Komponenten zunächst aus HPM-in-vivo-Gewebe isoliert und im Falle von Melanosomen und Melanin auch radioaktiv markiert. Dabei wurde sowohl eine in vivo Markierung (Protein- und Melaninanteil) der Melanosomen nach i.p. Injektion von radioaktivem Tyrosin in eine tumortragende Maus, als auch eine in vitro Markierung (nur Melaninanteil) von bereits isolierten Melanosomen durchgeführt.

Nach Inkubation von HPM-73 Zellen mit diesen markierten Melanosomen wurden diese von den Zellen mit einer hohen Aufnahmerate während der ersten 5 h, die dann in eine Phase mit verlangsamter Aufnahme überging, aufgenommen. Innerhalb der ersten 5 h wurden bereits mehr als 50% der Radioaktivität eingebaut, die bei fortlaufender Zufuhr von Melanosomen über 8 Tage in den Zellen zu finden war. Es konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß die Melanosomen als ganze Partikel von den Zellen inkorporiert wurden, weil 1. bei Verwendung von in

vivo markierten Melanosomen die Radioaktivität sowohl im Melanin- als auch im Proteinanteil der Zellen zu finden war,

2. nach 2-tägiger Praeinkubation mit radioaktiv markierten Melanosomen und anschließender Weiterzucht im Melanosomen-freien Medium auch nach 6 Tagen die Radioaktivität pro Kultur noch erhalten war und

3. mit der Aufnahme von Melanosomen auch der Melaniningehalt der Zellen anstieg. Dabei war der Melaniningehalt nicht nur um das Maß erhöht, wie durch den Melaniningehalt der aufgenommenen Melanosomen zu erwarten war, sondern es kam auch zu einer beträchtlichen zusätzlichen Stimulierung der intrazellulären Melaninsynthese durch die vermutlich mit den Melanosomen aufgenommene Tyrosinase. Diese Stimulierung der zellulären Melaninsynthese setzte nach einer einstündigen Verzögerung ein und nahm dann konstant zu bis sie nach etwa 2 - 3 Tagen parallel verlief zur Kurve der aufgenommenen Melanosomen.

Der starke Hinweis, daß die HPM-Zellen in der Lage sind, Melanosomen zu phagozytieren, wurde auch durch lichtmikroskopische Beobachtungen unterstützt. Besonders auffallend war, daß mit zunehmender Inkubationszeit der Anteil von großen, stark melaninhaltigen Zellen ("Rundzellen") zunahm. Diese Zellen könnten möglicherweise als nicht proliferierende, melaninspeichernde Zellen (Melanophagen) angesehen werden.

Die Melanosomenaufnahme wurde in Gegenwart von 2,4-Dinitrophenol (10^{-4} M) signifikant inhibiert.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die HPM-Zellen nicht nur zur Aufnahme von Melanosomen befähigt sind. Nach Inkubation mit radioaktiv markiertem Melanin wurde auch dieses in den Zellen wiedergefunden. Jedoch führte dieses aufgenommene

Melanin nicht zu einer Stimulierung der zelleigenen Melaninsynthese (wie im Falle der Melanosomen).

Dreitägige Inkubation der HPM-Zellen mit löslicher Tyrosinase führte auch zu einem Anstieg des zellulären Melaningehaltes. Allerdings scheint dieser in geringerem Maße stimulierend beeinflußt zu werden als im Falle von partikelgebundener Tyrosinase.

Anhand der gezeigten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, daß die HPM-Zellen die Fähigkeit besitzen, Melanosomen, Melanin und Tyrosinase zu phagozytieren bzw. zu pinozytieren. Dabei bewirkt einmal das aufgenommene Melanin eine Erhöhung des zellulären Melaningehaltes; zum anderen kommt es im Falle von aufgenommenen Melanosomen oder von Tyrosinase zu einer Stimulation der zellulären Melaninsynthese. Es besteht die Möglichkeit, daß diese zusätzliche Melaninsynthese auf die Aktivität der aufgenommenen Tyrosinase zurückzuführen ist, oder daß die aufgenommenen Melanosomen bzw. die Tyrosinase zu einer Aktivierung der zelleigenen "Melaninsynthese-Maschinerie" geführt haben. Jedoch ist anzunehmen, daß die aufgenommene Tyrosinaseaktivität in den Zellen zu einem Anstieg des Melaningehaltes führte aufgrund einer Korrelation zwischen Tyrosinaseaktivität, die den Zellen während der Inkubation zugeführt wurde, und dem Ausmaß der zellulären Melaninsynthese.

Literaturverzeichnis

- ADACHI, K. u. HALPRIM, K.M.: A Sensitive Fluorometric Assay Method for Mammalian Tyrosinase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 26 241-246 (1967)
- ARNOW, L.E.: The Preparation of DOPA Melanin. Science 87, 308 (1938)
- ATLAS OF TUMOR PATHOLOGY: Section XII, Transplantable and Transmissible Tumors of Animals. S. 51 - 56, Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC 1959
- BEDOYA, O.: Effect of Chloroquine on Malignant Lymphoreticular und Pigmented Cells in Vitro. Cancer Res. 30 1262 - 1275 (1970)
- BEIERWALTES, W.H. u. MITARB.: Visualizing Human Malignant Melanoma and Metastases. J. Amer. Med. Ass. 206 97 - 102 (1968)
- BENNETT, H.P.J. u. MITARB.: Structural Studies of α -Melanocyte-Stimulating-Hormone and a Novel β -Melanocyte-Stimulating-Hormone from the Neurointermediate Lobe of the Pituitary of the Dogfish Squalus Acanthis Biochem. J. 141 439 - 444 (1974)
- BENNETT, V. u. MITARB.: Mechanism of Action of Cholera Toxin and the Mobile Receptor Theory of Hormone Receptor - Adenylate Cyclase Interactions. Proc. Nat. Acad. Sci 72 33 - 37 (1975)
- BERGMEIER, H.U. u. MITARB.: Methoden der Enzymatischen Analyse Verlag Chemie, Weinheim 1970
- BERTLER, A. u. MIRARB.: A Method for the Fluorimetric Determination of Adrenalin and Noradrenalin in Tissues. Acta Physiol. Scand. 44 273 - 292 (1958)
- BITENSKY, M.W. u. BURSTEIN, S.R.: Effects of Cyclic Adenosine Monophosphate and Melanocyte Stimulating Hormon on Frog Skin in Vitro. Nature 208, 1282 - 1284 (1965)
- BLOCH, B. u. SCHAAF, F.: Pigmentstudien. Biochem. Zschr. 162 181 - 206 (1925)
- BLOIS, M.S. u. KALLMAN, R.F.: Incorporation of ^{14}C from 3,4-Dihydroxyphenylalanine-2- ^{14}C into the Melanin of Mouse Melanoma Cancer Res. 24 863 - 868 (1964)
- BOYD, C.M. u. MITARB.: ^{125}J -Labelled Chloroquine Analog in the Diagnosis of Ocular Melanomas. J. Nucl.Med. 12, 601 - 605 (1971)

- BRAY, G.A.: A Simple Efficient Liquid Scintillator for Counting Aqueous Solutions in a Liquid-Scintillation-Counter. *Anal. Chem.* 1 279 - 285 (1960)
- BRYAN, J.: Studies on Clonal Cartilage Strains I. *Exp Cell Res.* 52 319 - 326 (1968)
- BUNONASSISI, V. u. MITARB.: Hormone Producing Cultures of Adrenal and Pituitary Origin. *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.* 48 1184 - 1190 (1962)
- BURGER, H.C.J.: MSH in Vertebrates. *Ann. New York Acad. Sci.* 100, 669 - 677, (1963)
- BURKE, P.G. z. MILTON, G.W.: Imidazole Carboxamide Therapy in Advanced Malignant Melanoma. *Cancer* 27 744 ff (1971)
- BURNETT, J.B. u. MITARB.: Separation and Characterization of Multiple Forms of Tyrosinase from Mouse Melanoma. *Cancer Res.* 27 880 ff (1967)
- BURNETT, J.B.: The Tyrosinases of Mouse Melanoma. *J. Biol. Chem.* 246 3079 - 3091, (1971)
- BURTON, K.: The Relation between Synthesis of DNA and the Synthesis of Protein in the Multiplication of Bacteriophage T₂ *Biochem. J.* 61 473 - 483 (1955)
- BUTCHER, R.W. u. SUTHERLAND, E.W.: Adenosine - 3', 5'-phosphate in Biological Materials. *J. Biol. Chem* 237 1244 (1962)
- CADY, B. u. MITARB.: Contemporary Treatment of Malignant Melanoma. *Amer. J. Surg.* 129 472 - 482 (1975)
- CARLSSON, A. u. WALDECK, B.: A Fluorimetric Method for the Determination of Dopamine. *Act. Physiol. Scand.* 44 293 - 298 (1958)
- CERIOTTI, G.L.: Determination of Nucleic Acids in Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* 214, 59 - 70 (1955)
- CHEE, D.O. u. BODURTHA, A.J.: Facilitation and Inhibition of B16 Melanoma by BCG in Vivo and by Lymphoid Cells from BCG Treated Mice in Vitro. *Int. J. Cancer* 14 137 - 143 (1974)
- CHEN, T.R. u. SHAW, M.W.: Studies of a Cell Line Derived from Human Malignant Melanoma. In *Vitro* 10 216 - 223 (1974)
- CHEN, Y.M. u. CHAVIN, W.: Radiometric Assay of Tyrosinase and Theoretical Considerations of Melanin Formation. *Analyt. Biochem.* 13 234 - 258 (1965)
- CHEN, Y.M.: Solubization and Activation of Mammalian Melanoma Particulate Tyrosinase by Lipase Digestion, *Cancer Res.* 34 3192 - 3196 (1974)

- CHO-CHUNG, Y.S.: In Vivo Inhibition of Tumor Growth by Cyclic Adenosine 3', 5' Monophosphate Derivatives. *Cancer Res.* 34 3492 - 3496 (1974)
- COHEN, S.M. u. GREENSPAN, E.M.: Triple Combination Chemotherapy of Disseminated Melanoma. *Cancer* 29 1489 (1972)
- DALE, A.J. u. MITARB.: Studies on Chloroquine Retinopathy in Rabbits. *J. Amer. Med. Ass.* 193 241 - 243 (1965)
- DALL, J.L.C. u. KEANE, J.A.: Disturbances of Pigmentation with Chloroquine. *Brit. Med. J.* 1 1387 - 1389 (1959)
- DANNEEL, R.: Die Entstehung der Farbmuster bei Säugetieren. *Naturw. Rdsch.* 10 420 - 424 (1968)
- DAVIDSON u. YAMAMOTO: Regulation of Melanin Synthesis in Mammalian Cells as Studied by Somatic Hybridization, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 60 894 - 901 (1968)
- DOLJANSKI, L.: Sur le rapport entre la prolifération et l'activité pigmentogène dans les cultures d'épithélium de l'iris. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 105 343 - 345 (1930)
- DROCHMANS, P.: The Fine Structure of Melanin Granules. In: *Structure and Control of the Melanocyte*, S. 91 - 95; Springer Verlag, Berlin 1966
- EAGLE, H.: Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. *Science* 122 501 - 504 (1955)
- EBELING, A.H.: Cultures pures d'épithélium proliférant in vitro depuis dix-huit mois. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 90 562 - 563 (1924)
- FAN, K. u. MITARB.: Effect of Amino Acid and Serum Deprivation on the Regulation of RNA Synthesis in Cultured Chinese Hamster Ovary Cells. *Exp. Cell Res.* 82 111 - 118 (1973)
- FISCHER, A.: A Pure Strain of Cartilage Cells in Vitro. *J. Exp. Med.* 36 379 - 384 (1922)
- FISCHER, I.: Die Pigmentbildung des Irisepithels in vitro. *Arch. Exp. Zellforsch. Gewebezücht.* 21 92 - 154 (1938)
- FISCHER, R.D.: Medizinische Dissertation, Marburg 1969
- FITZPATRICK, T.B.: Mammalian Melanin Synthesis. *Transact. St. John's Hosp. Germ. Soc.* 51 1 (1965)
- FURMANSKI, P. u. MITARB.: Expression of Differentiated Functions in Mouse Neuroblastoma Mediated by Dibutylryl cyclic Adenosine Monophosphate. *Nature* 233 413 - 415 (1971)

- GERICKE, D. u. PRAKASH, C.: Inhibition of Cell Growth in Vitro by Adenosine - 3', 5'-Mono-phosphates. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 350 1469 (1969)
- GOLDBERG, B. u. MITARB.: Collagen Formation in Vitro by Established Mammalian Cell Lines. Exp. Cell Res. 31 444 - 447 (1963)
- GOODMAN, L.S. u. GILMAN, A.: Pharmacological Basis of Therapeutics. 5. Auflage. S. 1101 - 1105 New York, Toronto, London (1975)
- GRIMM, J. u. FRANK, W.: Stimulierung von Kulturen embryonaler Rattenzellen durch Kälberserum. II. Veränderung der ATP- und cAMP-Spiegel; Aktivierung einer cAMP spaltenden Phosphodiesterase. Naturforsch. 27b 562 - 566 (1972)
- HADLEY, Mac E. u. MITARB.: Regulation of Melanophore Stimulating Hormon (MSH) Release, Yale J. Biol. Med. 46 602 - 616 (1973)
- HAM, R.G. u. SATTLER, G.L.: Clonal Growth of Differentiated Rabbit Cartilage Cells. J. Cell Physiol. 72 109 - 114 (1968)
- HAMPERL, H.: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie. 28. Auflage, S. 144; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1968
- HANDBOOK OF BIOLOGICAL DATA S. 27 Saunders Company; Philadelphia, London (1956)
- HARDING, H.E. u. PASSEY, R.D.: A Transplantable Melanoma of the Mouse. J. Path. Bact. 33 417 - 427 (1930)
- HEIDRICK, M.L. u. RYAN, W.L.: Cyclic Nucleotides on Cell Growth in Vitro. Cancer Res. 30 376 - 378 (1970)
- HELLSTRÖM, I. u. HELLSTRÖM, K.E.: Some Recent Studies on Cellular Immunity to Human Melanomas. Federat. Proc. 32 156 - 159 (1973)
- HEMPEL, K.: Investigation of the Structure of Melanin in Malignant Melanoma with ³H- and ¹⁴C-Labelled DOPA at Different Positions. In: Structure and Control of the Melanocyte S. 162 - 175; Springer Verlag, Berlin 1966
- HIRSCH, H.H.: Tissue Autoxydation Inhibitors. Cancer Res. 15 249 - 255 (1955)
- HIRSCHHORN, K.: Procedure-Micro-Cultures for Chromosome Studies. In: Price and Reference Manual 1966, Grand Island Biol. Company S. 70
- ISHIKAWA, F. u. FITZPATRICK, T.B.: Some Recent Studies on the Subcellular Unit of Melanin Biosynthesis, the Melanosome. In: Structure and Control of the Melanocyte. S. 95 - 114; Springer Verlag, Berlin 1966

- JAINCHILL, J.L. u. TODARO, G.T.: Stimulation of Cell Growth in Vitro by Serum with and without Growth Factor. Exp. Cell Res. 59 137 - 146 (1970)
- JOHNSON, G.S. u. MITARB.: Restoration of Several Morphological Characteristics of Normal Fibroblasts in Sarcoma Cells Treated with cAMP and its Derivatives. Proc. Nat. Acad. Sci 68 425 - 429 (1971)
- JOHNSON, G.S. u. PASTAN, I.: N⁶,O^{2'}-Dibutyryl Adenosine 3', 5' Monophosphate Induces Pigment Production in Melanoma Cells. Nature New Biol. 237 267 - 268 (1972)
- KARLSON, P.: Biochemie, 8. Auflage S. 188; Thieme Verlag, Stuttgart 1972
- KARNOVSKY, M.L.: Energetics of Transport. Proto-plasma 63 76 - 85 (1967)
- KEEFE, E.O. u. CUATRECASAS, P.: Cholera Toxin Mimics MSH in Inducing Differentiation in Melanoma Cells. Proc. Nat. Acad. Sci. 71 2500 (1974)
- KIM, S.H. u. MITARB.: Enhancement of the Radiation Response of Cultured Tumor Cells by Chloro-quine. Cancer 32 536 - 540 (1973)
- KREIDLER, J.W. u. MITARB.: Cyclic Adenosine 3', 5' Monophosphate in the Control of Melanoma Cell Replication and Differentiation. J. Nat. Canc. Inst. 50 555 - 558 (1973)
- LEE, T.H. u. MITARB.: Species Differences and Structural Requirements for Melanocyte Stimulating Activity of MSH. Ann. New York Acad.Sci. 100 (1963)
- LERNER, A.B. u. MITARB.: Mammalian Tyrosinase Preparation and Properties. J. Biol. Chem. 178 185 - 195 (1949)
- LOWRY, O.H. u. MITARB.: Protein Measurement with the Folin Reagent. J. Biol. Chem. 193 265 - 275 (1951)
- LONG, C.: Biochemist's Handbook, S. 375; E.F.N. Spon Ltd. London 1961
- MAKINO, N. u. MAHILL, P.M.: The Oxidation State of Copper in Resting Tyrosinase. J. Biol. Chem. 249 6062 - 6066 (1974)
- MAVLIGIT, G.: Tumor-Directed Immune Reactivity and Immunotherapy in Malignant Melanoma. Immunol. Cancer 19 222 - 252 (1974)
- MENON, I.A. u. HABERMAN, H.F.: Activation of Tyrosinase in Microsomes and Melanosomes from B 16-and Harding-Passey-Melanomas. Arch. Biochem. Biophys. 137 231 - 242 (1970)

- MISHIMA, J.: Lysosomes in Melanin Phagocytosis and Synthesis. *Nature* 216 67 (1967)
- MISTINA u. ADAMS, J.F.: Non Premelanosomal and Premelanosomal Tyrosinase Activity in Green's Amelanotic and Melanotic Malignant Melanoma. *Cancer* 23 (1969)
- MOLL, F.: Das Phänomen des zweiten Boten. *Pharmazie in unserer Zeit* 2 117 - 121 (1973)
- MOON, J.H. u. MITARB.: Comparison of the Combination of 1,3-Bis (2-Chloroethyl)-1-Nitrosourea (BCNU) and Vincristine with Two Dose Schedules of 5-(3,3-Dimethyl-1-Triazino) Imidazole -4-Carboxamide (DTIC) in the Treatment of Disseminated Malignant Melanoma. *Cancer* 35 368- 371 (1975)
- MORLEY, G.D.: Humoral Regulation of Liver Regeneration and Tissue Growth. *Perspect. in Biol. Med.* 17 411 - 427 (1974)
- MORTON, D.C.: Immunotherapy of Human Malignant Melanomas and Sarcomas. *Nat. Cancer Inst.* 35 375 - 378 (1972)
- NOVALES, R.R. u. DAVIS, W.J.: Melanin-Dispersing Effect of Adenosine 3', 5' Monophosphate on Amphibian Melanophores. *Endocrinology* 81 283 - 290 (1967)
- OEY, J. u. MITARB.: Intracellular cAMP Concentration Responds Specifically to Growth Regulation by Serum. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71 694 - 698 (1974)
- OIKAWA, A.: Fate of L-3,5-³H Tyrosine in Cell-Free Extracts and Tissue Cultures of Melanoma Cells. A New Assay Method for Tyrosinase in Living Cells. *Arch. Bioch. Biophys.* 148 548 - 557 (1972)
- OYAMA, V.J. u. EAGLE, H.: Measurement of Cell Growth in Tissue Cultures with a Phenol Reagent (Folin Ciocalteu) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91 305 - 307 (1956)
- POMERANTZ, S.H.: Tyrosine Hydroxylation Catalyzed by Mammalian Tyrosinase; An Improved Method of Assay. *Biochem Biophys. Res. Com.* 16 188 (1964)
- POMERANTZ, S.H.: The Tyrosine Hydroxylase Activity of Mammalian Tyrosinase *J. Biol. Chem.* 241 161 (1966)
- PRASAD, K.N. u. HSIE, A.W.: Morphological Differentiation of Mouse Neuroblastoma Cells Induced in Vitro by Dibutyryl-cAMP. *Nature New Biol.* 233 141 - 142 (1971)
- REALLEXIKON DER MEDIZIN Band 4, S. M 89; Verlag Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien 1971

- ROBINSON, G.A. u. MITARB.: Cyclic AMP. Ann. Rev. Biochem. 37 149 (1968)
- ROBSON, N.C. u. SWAN, G.A.: Studies on the Structure of Some Synthetic Melanins. In: Structure and Control of the Melanocyte. S. 155 - 162; Springer Verlag, Berlin 1966
- RYAN, W.L. u. HEIDRICK, M.L.: Inhibition of Cell Growth in Vitro by Adenosine 3', 5' Monophosphate. Science 162 1484 (1968)
- SAMS, W.M.Jr.: Chloroquine: Mechanism of Action. Majo Clin. Proc. 42 300 - 309 (1967)
- SANDRITTER, W.: Histopathologie 4. Auflage, S. 267; Schattenaer Verlag, Stuttgart 1971
- SATO, G.H. U. YASUMURA, Y.: Retention of Differentiated Function in Dispersed Cell Culture. Transact. New York Acad. Sci. 28 1063 - 1079 (1966)
- SCHACHTSCHABEL, D.O. u. FERRO, J.J.: The Effect of 4-Aminopyrazolo (3,4-d)pyrimidine and Guanine on Ehrlich Ascites Tumor Cells in Culture. Exp. Cell. Res. 48 319 - 326 (1967)
- SCHACHTSCHABEL, D.O.: Biochemische und Cytologische Untersuchungen zum Stoffwechsel, zur Teilung und Differenzierung von Zellen des Harding Passey Melanoms und Ehrlich Ascites Tumor Zellen in Zellkultur. Habilitationsarbeit zur Erlangung der Venia Legendi, Marburg 1969
- SCHACHTSCHABEL, D.O. u. MITARB.: Untersuchungen zur Kontrolle der Melaninsynthese in Zellkulturen des Harding Passey Melanoms, Hoppe Seylers Z. Physiol Chem. 351 1402 - 1410 (1970)
- SCHACHTSCHABEL, D.O.: Spezifische Zellfunktionen von Zell- und Gewebekulturen. Virchows Arch. Abt. B Zellpathol. 7 27 - 36 (1971)
- SCHACHTSCHABEL, D.O.: Aging and Development. Akad. d. Wissensch. u.d. Lit. 4 16 - 40 (1972)
- SCHIEFERSTEIN, G.: Übersichten zur Immunologie des malignen Melanoms. Klin. Wschr. 53 241 - 253 (1975)
- SEFTON, B.M. u. RUBIN, H.: Stimulation of Glucose Transport in Cultures of Density-Inhibited Chick Embryo Cells. Proc. Nat. Acad. Sci. 68 3154 - 3157 (1971)
- SEIJI, M. u. MITARB.: Subcellular Localization of Melanin Biosynthesis. Ann. New York Acad. Sci. 100 497 (1963)
- SEIJI, M.: Int. Congr. Biochem. Abstr. 5 919 (1967)

- SEIJI, M. u. YOSHIDA, T.: Enzymatic Digestion of Smooth Surfaced Membrane of Mouse Melanoma. J. Biochem. (Tokyo) 62 670 (1968)
- SEIJI u. MITARB.: Tyrosinases in Membrane Systems of Mouse Melanoma. J. Inv. Dermatol. 54 97 (1970)
- SHEPPARD, J.R.: Difference in the cAMP Levels in Normal and Transformed Cells. Nature New Biol 236 14 (1972)
- SHODELL, M. u. RUBIN, H.: Studies on the Nature of Serum Stimulation of Proliferation in Cell Culture. In Vitro 6 66-74 (1970)
- STANKA, P.: Elektronenmikroskopische Untersuchung über die Praemelanosomenentstehung in retinalem Pigmentepithel in Hühnerembryonen. Z. Zellforsch. 112 120 - 128 (1971)
- STEFANOVICH, V. u. MITARB.: Inhibition of Various Cyclic AMP Phosphodiesterases by Pentiphylline and Theophylline. Arzneimittelforschung 24 1747 - 1751 (1974)
- SUGUIRA, K.: The Effects of Various Physical and Chemical Factors on Transplantable Mouse Melanoma. In: Biology of Melanomas New York Acad. Sci. (Special Publication) 4 369 - 387 (1948)
- UNSGAARD, B. u. O'TOOLE, C.: The Influence of Tumour Burden and Therapy on Cellular Cytotoxicity Responses in Patients with Ocular and Skin Melanoma. Brit. J. Cancer 31 301 - 313 (1975)
- VAN HEYNINGEN, W.E.: Gangliosides as Membrane Receptor for Tetanus Toxin, Cholera Toxin and Serotonin. Nature 249 415 - 417 (1974)
- VANWIJCK, R.: Potentiation and Arming of Lymphocyte Mediated Immunity by Sera from Melanoma Patients. Europ. J. Cancer 11 267 - 276 (1975)
- VAN WOERT, M.H.: Regulation of Tyrosinase Activity in Mouse Melanoma and Skin by Changes in Melanosomal Membrane Permeability. J. Invest. Dermatol. 56 343 - 348 (1971)
- VARGA, J.M. u. MITARB.: Regulation of Melanocyte Stimulating Hormone Action at the Receptor Level: Discontinuous Binding of Hormone to Synchronised Mouse Melanoma Cells During the Cell Cycle. Proc. Nat. Acad. Sci. 71 1590 - 1593 (1974)
- VRBA, M.: Human Malignant Melanomas of the Uvea in Cell Cultures. Neoplasma 21 421 - 432 (1974)
- WELLINGS, S.R. u. SIEGEL, B.V.: Role of Golgi Apparatus in the Formation of Melanin Granules in Human Malignant Melanoma. J. Ultrastruct. Res. 3 147 (1959)

- WHITTAKER, J.R.: Loss of Melanotic Phenotype in
Vitro by Differentiated Retinal Pigment Cells:
Demonstration of Mechanism Involved. Developm.
Biol. 15 553 - 574 (1967)
- WIEGANDT, H. u. MITARB.: Interaction of Ganglioside
G₁ and its Derivatives with Choleragen.
Europ. J. Biochem. 48 103 - 110 (1974)

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. D. Schachtschabel am Institut für Physiologische Chemie II der Philipps-Universität Marburg angefertigt. Sie wurde z.T. mit einer Sachbeihilfe der Stiftung Volkswagenwerk gefördert.

Herrn Prof. Dr. D. Schachtschabel danke ich für die anregenden Diskussionen und die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Frau Dr. R. Marx danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Schmitz-Moormann, Pathologisches Institut der Universität Marburg, danke ich für die histologischen Untersuchungen.

Für ihre Hilfeleistungen danke ich herzlich den technischen Assistentinnen H. Bonner und H. Kolitsch.

Frau U. Cyriax danke ich ferner für die sorgfältige Ausführung der Zeichnungen.

Lebenslauf

17.12.1947 geboren in Aachen als 2. Kind des
Jakob Conrads und seiner Frau
Anna, geb. Tings

1954-1958 Besuch der Katholischen Volksschule
Venwegen

1958-1964 Besuch der Realschule für Mädchen I,
Aachen

1964-Herbst
1966 Besuch des Staatlichen Einhard-
Gymnasiums, Aachen

21.10.1966 dort Ablegung der Reifeprüfung

Dez.1966 -
Nov.1968 Apotheken-Praktikum in der Merkur-
Apotheke, Aachen

10.9.1968 Pharmazeutisches Vorexamen,
Note: gut

20.9.1968 Eheschließung mit Heinz Leising

1968-1970 Apotheken-Assistenten Zeit in der
Goethe-Apotheke, Göttingen

SS 1970 +
WS 1970/71 Pharmaziestudium an der Phillips-
Universität, Marburg

SS 1971 +
WS 1971/72 Pharmaziestudium an der Eidgenössi-
schen Technischen Hochschule Zürich/
Schweiz

SS 1972 +
WS 1972/73 Pharmaziestudium an der Philipps-
Universität, Marburg

12.4.1973 Pharmazeutisches Staatsexamen,
Note: gut

SS 1973 -
WS 1975/76 Studium der Humanbiologie an der
Philipps-Universität und Disser-
tation unter der Anleitung von Herrn
Professor D. Schachtschabel über
Melaninsynthese und Endocytose-
eigenschaften von HARDING-PASSEY-
Melanomzellen

